

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年 7 月 5 日 (05.07.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/48052 A1

(51) 国際特許分類: C08G 65/337, A61K
38/21, 47/48, A61P 21/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/09159

(22) 国際出願日: 2000 年 12 月 22 日 (22.12.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願平 11/366312
1999 年 12 月 24 日 (24.12.1999) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 協和醗酵
工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.)
[JP/JP]; 〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目 6 番
1 号 Tokyo (JP).

(YAMASAKI, Motoo) [JP/JP]. 須澤敏行 (SUZAWA, Toshiyuki) [JP/JP]. 村上達也 (MURAKAMI, Tatsuya) [JP/JP]. 櫻井紀子 (SAKURAI, Noriko) [JP/JP]; 〒194-8533 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内 Tokyo (JP). 山下錦也 (YAMASHITA, Kinya) [JP/JP]. 向井真由美 (MUKAI, Mayumi) [JP/JP]. 榎原 隆 (KUWABARA, Takashi) [JP/JP]. 太田 聡 (OHTA, So) [JP/JP]. 三木一郎 (MIKI, Ichiro) [JP/JP]; 〒411-8731 静岡県駿東郡長泉町下土狩 1188 協和醗酵工業株式会社 医薬総合研究所内 Shizuoka (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

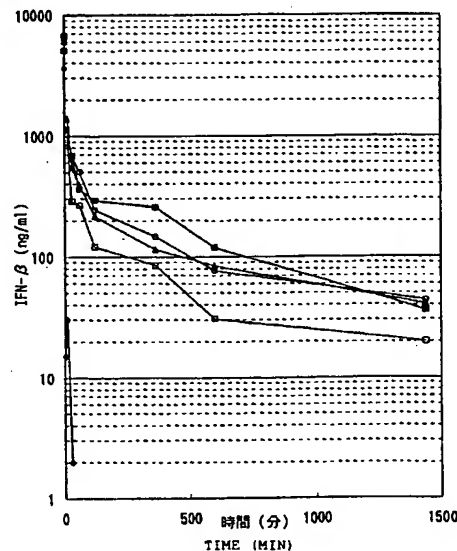
(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 山崎基生

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,

[続葉有]

(54) Title: BRANCHED POLYALKYLENE GLYCOLS

(54) 発明の名称: 分岐型ポリアルキレングリコール類



(57) Abstract: Branched polyalkylene glycols useful as reagents for chemically modifying physiologically active polypeptides wherein two single-chain polyalkylene glycols are attached to a group having a cyclic structure other than a planar structure and a group reactive with an amino acid side chain, the N-terminal amino group or the C-terminal carboxyl group in a polypeptide or a group which can be converted into such a reactive group is further attached thereto.

[続葉有]

WO 01/48052 A1



AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(57) 要約:

平面構造以外の環状構造を含有する基に2本の1本鎖ポリアルキレングリコール類が結合し、かつポリペプチド中のアミノ酸側鎖、N末端アミノ基またはC末端カルボキシル基と反応性を有する基か、該反応性を有する基に変換可能な基が結合し、生理活性ポリペプチド類の化学修飾試剤として有用な分岐型ポリアルキレングリコール類を提供する。

明 細 書

分岐型ポリアルキレングリコール類

技術分野

本発明は、生理活性を有するポリペプチド（生理活性ポリペプチド）の修飾剤として有用な分岐型構造を有するポリアルキレングリコール類および該ポリアルキレングリコール類で修飾された生理活性ポリペプチドに関する。さらに、該ポリアルキレングリコール類で修飾された生理活性ポリペプチドを含有する医薬に関する。

背景技術

生理活性ポリペプチドは特定の疾病に対する治療剤として有用であるが、血中に投与されると安定性が悪く、十分な薬理効果が期待できない場合が多い。例えば、分子量60,000程度以下のポリペプチドは血中に投与されても腎臓の糸球体より濾過され、大部分が尿中に排泄されるため、治療剤として用いたとしても大きな治療効果が得られず、繰り返しの投与が必要になる場合が多い。また、他のポリペプチドは血中に存在する加水分解酵素等によって分解され、生理活性を失うことがある。さらに、外因性の生理活性ポリペプチドにおいてもその生理活性が疾患の治療に有効なことがあるが、そのような外因性のポリペプチドや遺伝子組換えによって製造されたポリペプチド等は内因性のポリペプチドと構造が異なるため、血中に投与された場合には免疫反応を誘発し、アナフィラキシーショック等の重篤な副作用を起こす場合があることが知られている。さらに、生理活性ポリペプチドによってはそれが治療剤として用いられる際に、溶解性が悪い等の物性が問題になることも多い。

生理活性ポリペプチドを治療剤として用いる際のこれらの問題を解決する方法の一つとして、1分子以上の不活性型ポリマー鎖をポリペプチドに化学的に結合させる方法が知られている。多くの場合、ポリエチレングリコール等のポリアルキレングリコール類を該ポリペプチドに化学的に結合させることによって、該ポリペプチドや蛋白質に望ましい特性が付与されている。例えば、ポリエチレングリコールで修飾されたスーパーオキシドディスムターゼ（SOD）では血

中の半減期が著しく延長され、作用の持続性が見出されている〔ファーマシューティカル リサーチ コミュニケーション (Pharm. Research Commun.)、19巻、287頁 (1987年)〕。また、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) のポリエチレングリコール修飾も知られている〔ジャーナル オブ バイオケミストリー (J. Biochem.)、115巻、814頁 (1994年)〕。その他にもアスバラギナーゼ、グルタミナーゼ、アデノシンデアミナーゼ、ウリカーゼ等のポリエチレングリコール修飾ポリペプチドの例がGillian E. Francisらによってまとめられている〔ファーマシューティカル バイオテクノロジー (Pharmaceutical Biotechnology)、3巻、Stability of Protein Pharmaceuticals, Part B、235頁 (1992年)、Plenum Press, New York〕。また、生理活性ポリペプチドをポリアルキレングリコールで修飾することによって得られる効果としては、熱安定性が高まること〔生物物理、38巻、208頁 (1998年)〕、有機溶媒に可溶となること〔バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ (Biochem. Biophys. Res. Commun. : BBRC)、122巻、845頁 (1984年)〕等も知られている。

一方、ペプチドや蛋白質とポリアルキレングリコールとの結合方法についても、例えばポリアルキレングリコールの末端にカルボン酸の活性エステル、マレイミド基、カーボネート、塩化シアヌル、ホルミル基、オキシラニル基等を導入してポリペプチドのアミノ基やチオール基に結合する方法が知られている〔バイオコンジュゲート ケミストリー (Bioconjugate Chem.)、6巻、150頁 (1995年)〕。これらの技術の中には、ポリペプチド中の特定のアミノ酸残基に特異的にポリエチレングリコールを結合し、該ペプチドまたは蛋白質の生理活性を損なわずに血中安定性を向上させた例も含まれる。ポリペプチド中の特定のアミノ酸残基特異的なポリエチレングリコール修飾の例としては、成長ホルモン放出因子 (Growth Hormone-releasing Factor) のカルボキシ末端にノルロイシンのスペーサーを介してポリエチレングリコールを結合した例〔ジャーナル オブ ペプチド リサーチ (J. Peptide Res.)、49巻、527頁 (1997年)〕、インターロイキン-2の3位に遺伝子組換えによってシステインを導入し、この部位に特異的にポリエチレングリコールを結合した例〔バイオテクノロジー (BIO/TECHNOLOGY)、8巻、343頁 (1990年)〕等が知られている。

前記ポリアルキレングリコール修飾ポリペプチドの多くは、直鎖型ポリアルキレングリコールを結合させる方法により得られるが、高活性の化学修飾ポリペプチドを得る方法として、分岐型ポリエチレングリコールを結合させる方法が優れていることが見出されている。一般的に、ポリアルキレングリコールの分子量が大きいほど、あるいは修飾率が高いほど血中の持続性は向上することが知られているが〔ザ ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (The Journal of Biological Chemistry)、263巻、15064頁 (1988年)〕、修飾率を高くするとポリペプチドの生理活性が損なわれることがある。これは、生理活性に必要なポリペプチド中の特定のアミノ基やチオール基等が化学修飾剤によって修飾されることが一つの原因である。修飾率に応じて生理活性が低下する例としては、インターロイキン-15が知られている〔ザ ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (J. Biol. Chem.)、272巻、2312頁 (1997年)〕。一方、分子量の大きいポリアルキレングリコール類では、分子量分布が均一かつ純度の高いものを合成することが困難である。例えば、モノメトキシポリエチレングリコールの場合、不純物としてジオール成分の混入が知られている。そこで、現在利用できる分子量分布が狭くて高純度のポリアルキレングリコール類をスペーサーを介して分岐させることによって分子量の大きい修飾剤を製造しようとする試みが行われている。これによって、修飾率を低減しても持続性を保持したまま高い生理活性を有する化学修飾ポリペプチドが得られる。また、ポリアルキレングリコール類を分岐させることで生理活性ポリペプチド分子のより多くの表面をポリアルキレングリコールで覆うことができると考えられている。例えば、分岐構造を有する基に塩化シアヌルを利用した2本鎖型のポリエチレングリコール誘導体が知られている (特開平3-72469、特開平3-95200)。この場合、平均分子量5,000のメトキシポリエチレングリコールが利用されているが、この化合物ではトリアジン環由来の毒性が懸念される。また、特開平1-153088にはポリエチレングリコールと無水マレイン酸の共重合体である櫛形ポリエチレングリコールからは直鎖型ポリエチレングリコールと比較して低い修飾率で高活性の化学修飾ポリペプチドが得られることが開示されているが、この化合物ではポリペプチドとの反応サイトが多数存在し、かつ分子量分布が均一ではない。また、桂皮酸を原料に用いベンゼン環を介してポ

リエチレングリコールを分岐させた例（特開平3-88822）も知られている。前述したトリアジン環やベンゼン環を介した分岐型ポリアルキレングリコールの場合、分岐点の構造が平面であるためポリアルキレングリコール鎖の空間的運動が束縛され、分子サイズの増大効果には不利であると考えられる。他の例としてリジンを分岐点としてポリエチレングリコールを2本分岐させた化合物

（W096/21469、US5,643,575）等が知られているが、本発明の環状構造で分岐した化合物は知られていない。また、前述の従来型の分岐型ポリアルキレングリコール類は、ポリアルキレングリコール類を2分子以上結合することで分子量の増大を達成したものであるが、分岐型ポリアルキレングリコール類で生理活性ポリペプチドを修飾した場合、同じ分子量の直鎖型ポリアルキレングリコール類で修飾した場合に比較してより分子サイズを増大できるという性質は知られていない。

以上のような従来型ポリアルキレングリコール類の問題点を克服した、毒性が低く、安定性が改善され、分子サイズの増大効果に優れた修飾剤としての分岐型ポリアルキレングリコール類が求められている。

近年、インターフェロン β 製剤が、多発性硬化症の治療薬として注目されている〔ザ ランセット（The Lancet）、352巻、7号、1491頁（1998年）等〕。多発性硬化症は原因不明の脱髄性自己免疫疾患であり、中枢神経白質の血管周囲の細胞浸潤とそれに引き続いて起こる髄鞘破壊を特徴とする。その発生機序は不明であるが、免疫担当細胞による中枢神経の軸索を覆うミエリン鞘の破壊が脱髄斑を生じさせる結果、神経伝導障害が起こり、多様な神経機能の異常が発現すると考えられている。欧米ではインターフェロン β （IFN- β ）が、多発性硬化症の治療薬の主流となっているが、現在臨床で用いられているIFN- β 1b製剤は1日おきの皮下注射が必要である等の問題があり、活性が上昇し、かつ投与回数が少なくても有効な治療薬が要望されている。また、インターフェロン類は多発性硬化症に限らず、C型肝炎やB型肝炎等のウイルス性肝炎、白血病、リンパ腫、骨髄腫、骨肉腫、乳癌、腎癌、脳腫瘍等の各種癌の治療、ウイルス性あるいは炎症性皮膚疾患、眼疾患に有効であるほか〔薬局、41号、6巻、769頁（1990年）〕、血管新生が関与する疾患の治療薬となる可能性が示唆されている〔組織培養、22号、7巻、278頁（1996年）〕。これらの疾患でも同様に、

投与量ならびに投与回数が少なく、持続性の高い有効な治療薬が要望されている。

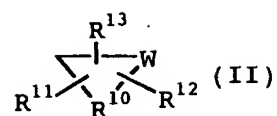
発明の開示

本発明の目的は、第一に生理活性ポリペプチドの化学修飾剤である従来型の分岐型ポリアルキレングリコール類の欠点を克服し、分子サイズを増大させる効果に優れた分岐型ポリアルキレングリコール類を提供することにある。第二には、該分岐型ポリアルキレングリコール類で修飾された生理活性ペプチドを提供することにある。

本発明者らは生理活性ポリペプチドを修飾するための新規構造を有する分岐型ポリアルキレングリコール修飾試剤について鋭意検討した。その結果、シクロアルカン等の立体的または運動性のある環状構造を有する化合物を用いてポリアルキレングリコール類を分岐させることで、分子量の増大効果および安定性に優れた修飾試剤が得られることを見出した。また生理活性ポリペプチドを上記分岐型ポリアルキレングリコール類で修飾したところ、活性が向上することも見いだした。さらに、生理活性ポリペプチドを上記分岐型ポリアルキレングリコール類で修飾したところ、修飾生理活性ポリペプチドにおいては、該生理活性を保持したまま、腎臓の糸球体での濾過が抑制されて、血中持続性が大幅に向上することを見出した。

以上のように、前記分岐型ポリアルキレングリコール類が化学修飾剤として優れていることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は平面構造以外の環状構造を含有する基に2本の1本鎖ポリアルキレングリコール類が結合し、かつポリペプチド中のアミノ酸側鎖、N末端アミノ基またはC末端カルボキシル基と反応性を有する基か、該反応性を有する基に変換可能な基が結合した分岐型ポリアルキレングリコール類、生理活性ポリペプチドまたはその誘導体の該ポリアルキレングリコール修飾体、および該ポリアルキレングリコール修飾体を含有する医薬あるいは治療剤を提供するものである。中でも平面構造以外の環状構造を含有する基が、式 (II)



〔式中、 R^{10} は $(CH_2)_u$ （式中、 u は1～10の整数を表す）または $CH=CH-(CH_2)_{ua}$ （式中、 ua は0～8の整数を表す）を表し、

R^{11} 、 R^{12} および R^{13} は同一または異なって、水素原子、水酸基、置換もしくは非置換の低級アルキル、低級アルコキシ、アミノ、カルボキシ、シアノまたはホルミルを表し、

W はO、S、 CH_2 または NR^{14} （式中、 R^{14} は水素原子または低級アルキルを表す）を表す〕で表される基から水素原子を3～5個除いた基であるのが好ましい。上記の中で、さらに式（II）において、 W が CH_2 であり、かつ u が4である場合が好ましい。また、別の観点からは、本発明は、生理活性ポリペプチドまたはその誘導体が少なくとも1個の上記ポリアルキレングリコール類で直接もしくはスペーサーを介して修飾された化学修飾ポリペプチド、および該化学修飾ポリペプチドを含有する医薬あるいは治療剤に関する。

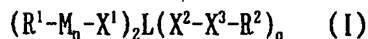
以下に、本発明を詳細に説明する。

平面構造以外の環状構造を含有する基としては、平面構造以外の環状構造を含有する基であればいかなる基も包含されるが、好ましくは平面構造以外の環状構造を含有する3分岐以上が可能な基、さらに好ましくは平面構造以外の環状構造を含有する3～5分岐が可能な基があげられる。

平面構造以外の環状構造を含有する基に結合する1本鎖ポリアルキレングリコール類としては、平面構造以外の環状構造を含有する基に結合が可能な1本鎖ポリアルキレングリコール類であればいかなるものも包含されるが、好ましくは $R^1-M_n-X^1$ （式中、 M 、 n 、 R^1 および X^1 は下記と同義である）があげられる。

ポリペプチド中のアミノ酸側鎖、N末端アミノ基またはC末端カルボキシル基と反応性を有する基、および該反応性を有する基に変換可能な基としては、ポリペプチド中のアミノ酸側鎖、N末端アミノ基またはC末端カルボキシル基と反応性を有する基、あるいは該反応性を有する基に変換可能な基であればいかなるものも包含される。

本発明の分岐型ポリアルキレングリコール類として好ましくは、式 (I)



{式中、Lは平面構造以外の環状構造を含有する3～5分岐が可能な基を表し、Mは OCH_2CH_2 、 $OCH_2CH_2CH_2$ 、 $OCH(CH_3)CH_2$ 、 $(OCH_2CH_2)_r-(OCH_2CH_2CH_2)_s$ (式中、rおよびsは同一または異なって、任意の正の整数を表す) または $(OCH_2CH_2)_{ra}-[OCH(CH_3)CH_2]_{sa}$ (式中、raおよびsaはそれぞれ前記rおよびsと同義である) を表し、

nは任意の正の整数を表し、

qは1～3の整数を表し、

R^1 は水素原子、低級アルキルまたは低級アルカノイルを表し、

R^2 はポリペプチド中のアミノ酸側鎖、N末端アミノ基またはC末端カルボキシル基と反応性を有する基か、該反応性を有する基に変換可能な基を表し、

X^1 は結合、O、S、アルキレン、 $O(CH_2)_{ta}$ (式中、taは1～8の整数を表す)、 $(CH_2)_{tb}O$

(式中、tbは前記taと同義である)、 NR^3 (式中、 R^3 は水素原子または低級アルキルを表す)、 $R^4-NH-C(=O)-R^5$ [式中、 R^4 は結合、アルキレンまたは $O(CH_2)_{tc}$ (式中、tcは前記taと同義である) を表し、 R^5 は結合、アルキレンまたは OR^{5a} (式中、 R^{5a} は結合またはアルキレンを表す) を表す]、 $R^6-C(=O)-NH-R^7$ [式中、 R^6 は結合、アルキレンまたは $R^{6a}O$ (式中、 R^{6a} は前記 R^{5a} と同義である) を表し、 R^7 は結合、アルキレンまたは $(CH_2)_{td}O$ (式中、tdは前記taと同義である) を表す]、 $R^8-C(=O)-O$ (式中、 R^8 は前記 R^{5a} と同義である) または $O-C(=O)-R^9$ (式中、 R^9 は前記 R^{5a} と同義である) を表し、

X^2 は結合、Oまたは $(CH_2)_{te}O$ (式中、teは前記taと同義である) を表し、

X^3 は結合またはアルキレンを表し、2つの $R^1-M_n-X^1$ および1つ～3つの $X^2-X^3-R^2$ はそれぞれ同一でも異なってもよい} で表される化合物 [以下、化合物 (I) と称する。他の式番号の化合物についても同様とする] があげられる。

式 (I) の各基の定義において、低級アルキルおよび低級アルカノイルの低級アルキル部分は、直鎖状または分岐状の炭素数1～8の、例えばメチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ネオペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル等を包含する。アルキレンは、炭素数1～8の、例えばメチレン、エチレン、n-プロピレン、イソブ

ロピレン、n-ブチレン、イソブチレン、sec-ブチレン、tert-ブチレン、ペンチレン、ネオペンチレン、ヘキシレン、ヘプチレン、オクチレン等を包含する。

式 (I) において、Mは OCH_2CH_2 、 $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ 、 $\text{OCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$ 、 $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_r-(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)_s$ (式中、rおよびsは同一または異なって、任意の正の整数を表す) または $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{ra}-[\text{OCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2]_{sa}$ (式中、raおよびsaはそれぞれ前記rおよびsと同義である) を表し、 $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_r-(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)_s$ (式中、rおよびsはそれぞれ前記と同義である) または $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{ra}-[\text{OCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2]_{sa}$ (式中、raおよびsaはそれぞれ前記と同義である) である場合、rおよびs並びにraおよびsaは、好ましくは1~100,000であり、さらに好ましくは1~1,000である。

式 (I) において、nは任意の正の整数を表し、好ましくは10~100,000であり、さらに好ましくは100~1,000である。

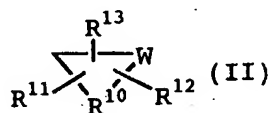
M_n で表されるポリアルキレングリコール部分の平均分子量は、約1,000~1,000,000が好ましく、5,000~100,000がさらに好ましい。 M_n が $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$ である場合、原料となるポリエチレングリコール類は M_w (重量平均分子量) / M_n (数平均分子量) で表される分子量分布が1.1以下の単分散のものが望ましく、平均分子量30,000以下であれば市販のものを用いることができる。例えば、平均分子量が2,000、5,000、10,000、12,000、20,000等のモノメトキシポリエチレングリコールが利用できる。

本発明において開示される、平面構造以外の環状構造を含有する基に2本の1本鎖ポリアルキレングリコール類が結合し、かつポリペプチド中のアミノ酸側鎖、N末端アミノ基またはC末端カルボキシル基と反応性を有する基か、該反応性を有する基に変換可能な基が結合した分岐型ポリアルキレングリコール類、式 (I) で表される分岐型ポリアルキレングリコール類の分子量は、500~1,000,000であることが望ましい。

式 (I) において、qは1~3の整数を表し、好ましくは1である。

式 (I) において、Lは平面構造以外の環状構造を含有する3~5分岐が可能な基であり、環状構造上の置換基として、水酸基、置換もしくは非置換の低級アルキル、低級アルコキシ、アミノ、カルボキシ、シアノまたはホルミル等を有していてもよい。ここで、低級アルキルおよび低級アルコキシの低級アルキル部分は、前記低級アルキルと同義であり、置換低級アルキルにおける置換基と

しては、水酸基、アミノ、低級アルカノイルオキシ、低級アルカノイルアミノ、低級アルコキシ、低級アルコキシアルコキシ、低級アルカノイル、低級アルコキシカルボニル、低級アルキルカルバモイル、低級アルキルカルバモイルオキシ等があげられる。低級アルカノイルオキシ、低級アルカノイルアミノ、低級アルコキシ、低級アルコキシアルコキシ、低級アルカノイル、低級アルコキシカルボニル、低級アルキルカルバモイルおよび低級アルキルカルバモイルオキシの低級アルキル部分は、前記低級アルキルと同義である。Lとしては、例えば、シクロヘキサン類、シクロヘキセン類、単糖類等から水素原子3～5個除いた基があげられる。上記シクロヘキサン類、シクロヘキセン類、単糖類の具体例としては、シクロヘキサントリカルボン酸、シクロヘキサントリオール、1,3,5-トリメチル-1,3,5-シクロヘキサントリカルボン酸 (Kemp's triacid)、キナ酸 (Quinic acid)、ジアミノシクロヘキサン、2,4,10-トリオキサアダマンタン、イノシトール、シキミ酸 (Shikimic acid)、D,L-ソルビトール、リボース、エリスリトール等およびそれらの立体異性体があげられる。Lとして好ましくは、式 (II)



(式中、 R^{10} は前記と同義であり、 R^{11} 、 R^{12} および R^{13} はそれぞれ前記と同義であり、Wは前記と同義である) で表される化合物から水素原子を3～5個除いた基があげられる。

式 (II) において、Wが CH_2 であり、かつuが4である場合が好ましい。

ここで、低級アルキルおよび低級アルコキシの低級アルキル部分は、前記低級アルキルと同義であり、置換低級アルキルにおける置換基は、前記置換低級アルキルの置換基と同義である。

L部分の構造の構築は市販品の化合物をそのまま利用するか、一般の有機合成法によってポリアルキレングリコール類の結合に適した形に誘導体化して利用するか、あるいは官能基の保護を行った後に利用して行うことができる〔日本

化学会編、実験化学講座 第4版(1992年)、有機合成I~V、丸善、プロテクティブ グループス イン オーガニック シンセシス (PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS)、第2版、ジョン ワイリー アンド サンズ インコーポレイテッド (JOHN WILEY & SONS, INC.) (1991年) 等]。

上記で例示した以外のシクロヘキサン類は、例えば木曾ら [大有機化学、第6巻、183頁 (1958年)、朝倉書店] またはG. E. McCaslandとE. Clide Horswill [ジャーナル オブ アメリカン ケミカル ソサイティ (Journal of American Chemical Society)、76巻、2373頁 (1954年)] の方法等に従って合成することができる。

また、例えば、ベンゼン環を有する化合物をS. IsodaとH. Yamaguchiの方法 [ケミカル アンド ファーマシューティカル ブルチン (Chem. Pharm. Bull.)、28 (8) 巻、2337頁 (1980年)]、K. PrasadとO. Repicの方法 [テトラヘドロン レターズ (Tetrahedron Letters)、25 (23) 巻、2435頁 (1984年)] 等で平面構造以外の環状構造を有する3~5分岐が可能な化合物に変換してL部分の構造の構築を行うこともできる。

化合物 (I) において、X'を介したポリアルキレングリコール類とLとの結合は通常の有機合成法で知られている反応を容易に組み合わせて行うことができる [日本化学会編、実験化学講座 第4版、19-23頁 (1992年)、有機合成I~V、丸善]。

式 (I) において、R²はポリペプチド中のアミノ酸側鎖、N末端アミノ基またはC末端カルボキシル基と反応性を有する基か、該反応性を有する基に変換可能な基を表す。

すなわち、上記反応性を有する基としては、ポリペプチド中の、リジン、システイン、アルギニン、ヒスチジン、セリン、スレオニン、トリプトファン、アスパラギン酸、グルタミン酸、グルタミン等の各側鎖、N末端アミノ基、C末端カルボキシル基のいずれかと反応性を有する基が包含され、例えば水酸基、カルボキシ、ホルミル、アミノ、ビニルスルホニル、メルカプト、シアノ、カルバモイル、ハロゲン化カルボニル、ハロゲン化低級アルキル、イソシアナート、イソチオシアナート、オキシラニル、低級アルカノイルオキシ、マレイミド、スクシンイミドオキシカルボニル、置換もしくは非置換のアリールオキシ

カルボニル、ベンゾトリアゾリルオキシカルボニル、フタルイミドオキシカルボニル、イミダゾリルカルボニル、置換もしくは非置換の低級アルコキシカルボニルオキシ、置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニルオキシ、トレスル、低級アルカノイルオキシカルボニル、置換もしくは非置換のアロイルオキシカルボニル、置換もしくは非置換のアリールジスルフィド、アジド等があげられる。

上記の各基の定義において、低級アルコキシカルボニルオキシ、ハロゲン化低級アルキル、低級アルカノイルオキシおよび低級アルカノイルオキシカルボニルの低級アルキル部分は、前記低級アルキルと同義である。アリールオキシカルボニル、アリールオキシカルボニルオキシおよびアリールジスルフィドのアリール部分としては、炭素数6~14の、例えばフェニル、ナフチル、ピフェニル、アントリル等があげられる。アロイルオキシカルボニルのアロイル部分としては、炭素数7~13の、例えばベンゾイル、ナフトイル、フタロイル等があげられる。ハロゲン化カルボニルおよびハロゲン化低級アルキルのハロゲン部分としては、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素の各原子があげられる。

置換低級アルコキシカルボニルオキシにおける置換基としては、同一または異なって置換数1~3の、例えば、水酸基、カルボキシ、ハロゲン等があげられる。ここで、ハロゲンは、前記と同義である。

置換アリールオキシカルボニル、置換アリールオキシカルボニルオキシ、置換アリールジスルフィドおよび置換アロイルオキシカルボニルにおける置換基としては、同一または異なって置換数1~3の、例えば水酸基、カルボキシ、ハロゲン、シアノ、低級アルキル等があげられる。ここで、ハロゲンおよび低級アルキルは、それぞれ前記と同義である。

R^2 で表される基は、L部分の構造を構築する原料に含まれていてもよいし、該原料化合物中の必要な官能基をあらかじめ適当な保護基 [PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS、第2版、JOHN WILEY & SONS, INC. (1991年) 等] で保護し、 X^1 を介してポリアルキレングリコール類をLに結合して分岐させた後に脱保護、さらには必要により変換して形成してもよい。さらにポリアルキレングリコール類を X^1 を介してLから分岐させた後に、通常の有機合成法によってLに必要により X^2 または X^3 を介して前記 R^2 を導入することもできる。

より具体的には、例えば以下の製造法で本発明の分岐型ポリアルキレングリコール類を製造することができる。なお、本発明の分岐型ポリアルキレングリコール類の製造法は、これらに限定されるものではない。

製造法 1 : X^I が結合、0、アルキレン、 $O(CH_2)_{ta}$ 、または $(CH_2)_{tb}O$ である化合物の製造

化合物 (I) のうち、 X^I が結合、0、アルキレン、 $O(CH_2)_{ta}$ (式中、 ta は前記と同義である)、または $(CH_2)_{tb}O$ (式中、 tb は前記と同義である) である化合物 (Ia) は、例えば以下の方法により製造することができる。

水酸基を2個所以上有する環状ポリオール類 (以下、本明細書において環状ポリオール類というときは、環状構造上の置換基として水酸基以外に、ヒドロキシ低級アルキル等を有する化合物も包含する) を、無水状態で N,N -ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、トルエン、テトラヒドロフラン、アセトニトリル、ピリジン等の適当な溶媒に溶解または懸濁し、1~30モルの水素化ナトリウム、酸化亜鉛、水酸化ナトリウム、トリエチルアミン等の適当な塩基の存在下、ポリアルキレングリコールまたはそのモノアルキルエーテルもしくはモノカルボン酸エステル (以下、これらをまとめてポリアルキレングリコール類Aという) のハロゲン化物もしくはトシル化物を1~3モル相当加えて、 $-20 \sim 150^\circ\text{C}$ で1時間~10日間反応させて、2本鎖分岐型ポリアルキレングリコール類を含む混合物が得られる。

環状ポリオール類はシクロヘキサントリオール、キナ酸、シキミ酸、グルコース、ソルビトール、リボース、エリスリトール等の市販の化合物、または市販の化合物から導かれる化合物から選ばれる。市販の化合物から導かれる化合物としては、例えば、シクロヘキサントリカルボン酸やKemp's triacid等から選ばれる環状ポリカルボン酸を通常の有機合成法 [日本化学会編、実験化学講座 第4版、19~21巻 (1992年)、丸善] に従って適当な還元剤で還元することによって得られる環状ポリオール類があげられる。還元剤としては、水素化リチウムアルミニウム、水素化ホウ素ナトリウム、シアノ水素化ホウ素ナトリウム、水素等があげられる。

環状ポリオール類中の水酸基の配置は何れでもよく、反応に不必要な官能基

をPROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS、第2版、JOHN WILEY & SONS, INC. (1991年)等に記載の方法によって適当に保護、あるいは誘導体化してから、反応に使用することができる。

ポリアルキレングリコール類Aのハロゲン化物およびトシル化物はSamuel Zalipskyの総括 [バイオコンジュゲート ケミストリー (Bioconjugate Chem.)、6巻、150頁 (1995年)] 等に開示された各種の方法で容易に製造することができる。結合に使用するポリアルキレングリコール類Aのハロゲン化物およびトシル化物としては分子量分布が均一であれば (好ましくは、 M_w/M_n が1.1以下) いかなる平均分子量のものも用いられる。

得られた2本鎖分岐型ポリアルキレングリコール類を含む混合物はそのままの純度、あるいはイオン交換クロマトグラフィーや逆相クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、二相分配、再結晶等の既知の方法で任意の純度の2本鎖分岐型ポリアルキレングリコール類に精製、単離して、次のステップに用いることができる。ここまでの工程で、化合物 (Ia) のうち、 R^2 が水酸基である化合物 (Iaj) のいくつかが得られる。

一方、環状ポリハライド類または環状ポリトシル類とポリアルキレングリコール類Aを使用することによっても目的の2本鎖分岐型ポリアルキレングリコール類を調製することができる。この場合、1~3モル相当のポリアルキレングリコール類AをN,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、トルエン、テトラヒドロフラン等の適当な溶媒に溶解または懸濁し、1~30モルの水素化ナトリウム、酸化亜鉛、水酸化ナトリウム、トリエチルアミン等の適当な塩基の存在下、1モル相当の環状ポリハライド類または環状ポリトシル類を加えて、-20~150°Cで1時間~10日間反応させて目的物が得られる。

環状ポリハライド類は市販の化合物であるか、前記環状ポリオール類をハロゲン化合物に変換 [日本化学会編、実験化学講座、第4版、19巻 (1992年)、丸善] して得られる。環状ポリトシル類は環状ポリオール類をN,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、トルエン、テトラヒドロフラン、アセトニトリル、ピリジン等の適当な溶媒に溶解または懸濁し、1~30モルの水素化ナトリウム、酸化亜鉛、水酸化ナトリウム、トリエチルアミン、カリウムナフタレン等の適当な塩基の存在下、水酸基当たり1~3モル相当のハロゲン化トシルを

加えて、 $-20\sim 150^{\circ}\text{C}$ で1時間～数日間反応させることで得ることができる。

次に、得られた2本鎖分岐型ポリアルキレングリコール類を含む混合物または精製化合物に、 R^2 を導入する。 R^2 としては、ポリアルキレングリコール類Aまたはそのハロゲン化物もしくはトシル化物を環状ポリオール類、環状ポリハライド類または環状ポリトシル類に結合した後、環状ポリオール類、環状ポリハライド類または環状ポリトシル類に残存している官能基をそのまま利用するか、あるいはあらかじめ環状ポリオール類に結合している官能基を保護しておき、ポリアルキレングリコール類Aまたはそのハロゲン化物もしくはトシル化物を結合後、官能基の保護基を除去して得られる基を利用してもよい。この場合、前記環状ポリオール類、環状ポリハライド類または環状ポリトシル類中の1個所以上の水酸基、または他の官能基を適当な保護基で保護した後、前記と同様の方法で残りの水酸基、ハロゲンまたはトシル基部分にポリアルキレングリコール類Aまたはそのハロゲン化物もしくはトシル化物を導入し、2本のポリアルキレングリコールが結合した化合物を合成し、保護基を除去した官能基をそのまま利用するか、あるいは該官能基の少なくとも一つを後述する方法に従って R^2 に変換する。ポリアルキレングリコール類Aまたはそのハロゲン化物もしくはトシル化物を結合する前、もしくは結合した後に環状ポリオール類、環状ポリハライド類または環状ポリトシル類に存在する官能基としては、水酸基の他に、カルボキシ、アミノ、ハロゲン、シアノ、ホルミル、カルボニル等がある。適当な官能基の保護基としては水酸基の場合、ベンジル、tert-ブチル、アセチル、ベンジロキシカルボニル、tert-ブチロキシカルボニル、ジメチルtert-ブチルシリル、ジフェニルtert-ブチルシリル、トリメチルシリル、トリフェニルシリル、トシル、テトラヒドロピラニル等があげられ、アミノの場合、メチル、エチル、9-フルオレニルメチロキシカルボニル、ベンジロキシカルボニル、ニトロベンジロキシカルボニル、N-フタルイミド、アセチル、tert-ブチロキシカルボニル等があげられ、カルボキシの場合、ベンジル、メチル、エチル、tert-ブチル、9-フルオレニルメチル、メトキシエトキシメチル、2,2,2-トリクロロエチル、2-(トリメチルシリル)エチル、シンナモイル、アリル、ニトロフェニル等があげられ、ホルミルの場合、ジメチルアセタール、ジエチルアセタール、ジベンジルアセタール、1,3-ジオキサニル等があげられる [PROTECTIVE

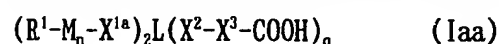
GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS、第2版、JOHN WILEY & SONS, INC. (1991年)]。

あらかじめ存在する官能基をそのまま、または保護、脱保護して R^2 として利用でき、L部分の構造を構築する原料となる環状ポリオール類、環状ポリハライド類または環状ポリトシル類の具体例としては、シキミ酸、キナ酸、Kemp's triacid等があげられる。

化合物 (I) のうち、Lを含む化合物に新たに置換基 R^2 を導入して得られる化合物の場合、例えば以下の製造方法で容易に製造を行うことができる。

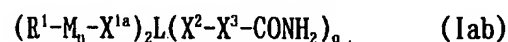
製造法 1 - 1

化合物 (Ia) のうち、 R^2 がカルボキシである式 (Iaa)



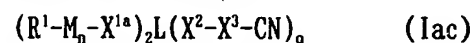
(式中、 X^{1a} は結合、O、アルキレン、 $O(CH_2)_u$ 、または $(CH_2)_uO$ を表し、 R^1 、L、M、n、q、 X^2 および X^3 はそれぞれ前記と同義である) で表される化合物、

R^2 がカルバモイルである式 (Iab)



(式中、 R^1 、L、M、n、q、 X^{1a} 、 X^2 および X^3 はそれぞれ前記と同義である) で表される化合物、

R^2 がシアノである式 (Iac)



(式中、 R^1 、L、M、n、q、 X^{1a} 、 X^2 および X^3 はそれぞれ前記と同義である) で表される化合物は例えば以下のように合成することができる。

化合物 (Iaa)、化合物 (Iab) および化合物 (Iac) は、環状ポリオール類を用いて、例えば製造法 1 に従って得られる化合物 (Ia) のうち、 R^2 として水酸基を有する化合物 (Iaj) を含む反応混合物または精製化合物を水、塩化メチレン、トルエン、テトラヒドロフラン等の適当な溶媒中、触媒量または1~20%の塩基存在下、1~30モル相当のアクリル酸、アクリルアミド、アクリロニトリル等と、-20~150°Cで1時間~数日間反応させて得ることができる。塩基としては、水酸化カリウム、水酸化ナトリウム、水素化ナトリウム等があげられる。

また、化合物 (Iaa) は、例えば製造法 1 で得られる化合物 (Iaj) を含む反応混合物または精製化合物を無水状態でN,N-ジメチルホルムアミド、ジメチル

スルホキシド、トルエン、テトラヒドロフラン等の適当な溶媒に溶解または懸濁し、1~50モルの水素化ナトリウム、酸化亜鉛、水酸化ナトリウム、トリエチルアミン等の適当な塩基の存在下、1~50モル相当の α -ハロゲン化酢酸エステルと、-20~150°Cで1時間~数日間反応させた後、加水分解して得ることもできる。

さらに、化合物(Iaa)は、例えば製造法1で得られる化合物(Iaj)をN,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、トルエン、テトラヒドロフラン等の適当な溶媒に溶解または懸濁し、1~50モルの水素化ナトリウム、酸化亜鉛、水酸化ナトリウム、トリエチルアミン等の適当な塩基の存在下、1~50モルのスクシンイミジルカーボネート、p-ニトロフェニルクロロホルメート、カルボニルジイミダゾール等の活性化剤と、-20~100°Cで1時間~10日間反応させて活性化し、その後、 γ -アミノ酪酸、グリシン、 β -アラニン等のアミノ酸またはその誘導体と反応させることによっても得られる。

また、製造法1で得られる化合物(Iaj)を前記同様の塩基存在下、無水コハク酸、無水グルタル酸等の酸無水物と反応させることによっても化合物(Iaa)を製造することができる。

また、化合物(Iaa)は、例えば環状ポリハライド類を用いて製造法1に従って、化合物(Ia)のうち R^2 がハロゲン化低級アルキルである化合物(Iai)を製造した後、ヒドロキシカルボン酸エステル、マロン酸エステル、 γ -アミノ酪酸のエステル体、 β -アラニンのエステル体、グリシンのエステル体等をN,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、トルエン、テトラヒドロフラン等の適当な溶媒に溶解または懸濁し、1~50モルの水素化ナトリウム、酸化亜鉛、水酸化ナトリウム、トリエチルアミン等の適当な塩基の存在下、化合物(Iai)を加え、-20~150°Cで1時間~数日間反応を行った後、加水分解して得ることもできる。

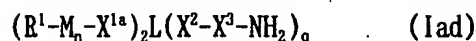
さらに、化合物(Iaa)は、例えば前記環状ポリオール類もしくは環状ポリハライド類の一個所以上の水酸基またはハロゲンを、あらかじめカルボン酸あるいはカルボン酸の保護体を含む残基で置換し、これを用いて製造法1で示した方法で環状ポリオール類もしくは環状ポリハライド類の残りの2個所の水酸基またはハロゲンをポリアルキレングリコール類Aまたはそのハロゲン化物もし

くはトシル化物で置換することでも得ることができる。この場合、カルボン酸またはカルボン酸の保護体を含む残基の導入は、前記と同様にして行うことができる。カルボン酸を保護した場合には、ポリアルキレングリコール類Aまたはそのハロゲン化物もしくはトシル化物を環状ポリオール類もしくは環状ポリハライド類に導入した後に脱保護して遊離カルボン酸を生成させる。

カルボン酸に変換された化合物は、陰イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、二相分配、再結晶等の既知の方法で、任意の純度で精製、単離することができる。

製造法 1-2

化合物 (Ia) のうち、 R^2 がアミノである式 (Iad)



(式中、 R^1 、 L 、 M 、 n 、 q 、 X^{1a} 、 X^2 および X^3 はそれぞれ前記と同義である)で表される化合物は、例えば製造法 1-1 で得られる化合物 (Iac) に適当な還元剤を作用させて得られる。還元剤としては、水素化リチウムアルミニウム、水素化ホウ素ナトリウム、シアノ水素化ホウ素ナトリウム、水素等があげられる。

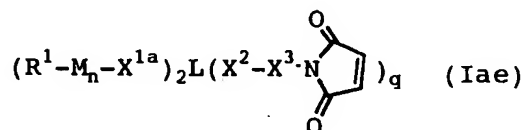
また、化合物 (Iad) は、例えば製造法 1 で得られる化合物 (Iai) または化合物 (Iai) 中のハロゲン部分がトシル基で置換された化合物に5当量～過剰量のエチレンジアミン、プロピレンジアミン等のジアミン類を適当な塩基存在下で反応させることによっても得られる。

さらに、製造法 1-1 で示したのと同様に、化合物 (Iad) は、例えば化合物 (Iaj) を N,N -ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、トルエン、テトラヒドロフラン等の適当な溶媒に溶解または懸濁し、1～50モルの水素化ナトリウム、酸化亜鉛、水酸化ナトリウム、トリエチルアミン等の適当な塩基の存在下、1～50モルのスクシンイミジルカーボネート、 p -ニトロフェニルクロロホルメート、カルボニルジイミダゾール等の活性化剤と、 $-20 \sim 100^\circ\text{C}$ で1時間～10日間反応させて活性化し、その後、1当量～過剰量のエチレンジアミンやプロピレンジアミン等のジアミン類と適当な塩基存在下で反応させることによっても得られる。

また、化合物 (Iad) は、例えば製造法 1 で示した方法に準じ、あらかじめ L

を形成させるために利用する環状ポリオール類等の化合物に1個所以上のアミノまたはアミノの保護体を導入し、これを用いて該化合物の残りの水酸基またはハロゲン部分にポリアルキレングリコール類Aまたはそのハロゲン化物もしくはトシル化物を2個所置換させる方法によっても得られる。

化合物 (Ia) のうち、 R^2 がマレイミドである式 (Iae)



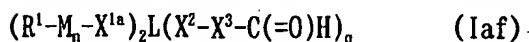
(式中、 R^1 、 L 、 M 、 n 、 q 、 X^{1a} 、 X^2 および X^3 はそれぞれ前記と同義である)で表される化合物は、例えばOskar Kellerらの方法[ヘルベチカ キミカ アクタ(Helv. Chim. Acta)、58巻、531頁(1975年)]またはTimothy P. Koganらの方法[シンセティック コミュニケーション(Synthetic Commun.)、22巻、2417頁(1992年)]に従い、化合物(Iad)とN-アルコキシカルボニルマレイミドとを飽和炭酸水素ナトリウム水溶液中で反応させることで得ることができる。N-アルコキシカルボニルマレイミドとしてはN-エトキシカルボニルマレイミドやN-メトキシカルボニルマレイミドを用いることができる。

また、化合物(Iae)は、例えば製造法1で示した方法に準じ、あらかじめLを形成させるために利用する環状ポリオール類等の化合物に1個所以上のマレイミドを導入し、これを用いて該化合物の残りの水酸基またはハロゲン部分にポリアルキレングリコール類Aまたはそのハロゲン化物もしくはトシル化物を2個所置換させる方法によっても得られる。

化合物(Iad)、化合物(Iae)およびそれらの合成中間体は、前記と同様の方法で任意の純度のものとして単離、精製することができる。

製造法1-3

化合物(Ia)のうち、 R^2 がホルミルである式(Iaf)



(式中、 R^1 、 L 、 M 、 n 、 q 、 X^{1a} 、 X^2 および X^3 はそれぞれ前記と同義である)で表さ

れる化合物は、例えば製造法1で得られる化合物(Ia)のうち R^2 としてヒドロキシメチルを有する化合物(Iag)を適当な酸化剤で酸化することによって得られる。酸化剤としては塩化クロム酸ピリジニウム、クロム酸、銀イオン、ジメチルスルホキシド等があげられる。また、化合物(Iaa)を前記と同様に適当な還元剤で還元することによっても得ることができる。

また、例えば製造法1で得られる化合物(Iaj)、化合物(Iai)または化合物(Iai)中のハロゲン部分がトシル基で置換された化合物にアミノエチルアセタール、ヒドロキシエチルアセタール、ハロゲン化エチルアセタール、ハロゲン化メチルアセタール等を結合させ、次いでアセタールを除去することによってもホルミルを導入することができる。

同様にして、製造法1で得られる化合物(Iaj)を用い、製造法1-1で示した方法に準じて水酸基を活性化し、続いてアミノエチルアセタール、ヒドロキシエチルアセタール等を結合させ、次いでアセタールを除去することによってもホルミルを導入することができる。

また、化合物(Iaf)は、例えば製造法1で示した方法に準じ、あらかじめLを形成させるために利用する環状ポリオール類等の化合物に1個所以上のアルデヒド、あるいはアルデヒドの保護体を導入し、これを用いて該化合物の残りの水酸基またはハロゲン部分にポリアルキレングリコール類Aまたはそのハロゲン化物もしくはトシル化物を2個所置換させる方法でも得られる。

化合物(Iaf)およびその合成中間体は、前記と同様の方法で任意の純度のものとして単離、精製することができる。

製造法1-4

化合物(Ia)のうち、 R^2 がハロゲン化カルボニルである式(Iah)

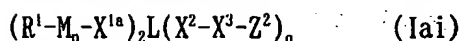
$$(R^1-M_n-X^{1a})_2L(X^2-X^3-C(=O)-Z^1)_q \quad (Iah)$$

(式中、 Z^1 はハロゲンを表し、 R^1 、 L 、 M 、 n 、 q 、 X^{1a} 、 X^2 および X^3 はそれぞれ前記と同義である)で表される化合物は、例えば R^2 がカルボキシである化合物(Iaa)をハロゲン化チオニルまたはハロゲン化チオニルとトルエン、ジメチルホルムアミド等の適当な混合溶媒中、ピリジン、トリエチルアミン等の適当な触媒存在下で、0~150°Cで1~24時間加熱することによって得られる。

ハロゲン化カルボニルにおけるハロゲンは前記ハロゲンと同義である。

製造法 1 - 5

化合物 (Ia) のうち、 R^2 がハロゲン化低級アルキルである式 (Iai)



(式中、 Z^2 はハロゲン化低級アルキルを表し、 R^1 、 L 、 M 、 n 、 q 、 X^{1a} 、 X^2 および X^3 はそれぞれ前記と同義である)で表される化合物は、例えば R^2 が水酸基である化合物 (Iaj) をハロゲン化チオニルまたはハロゲン化チオニルとトルエン、ジメチルホルムアミド等の適当な混合溶媒中、ピリジン、トリエチルアミン等の適当な触媒存在下で、0~150°Cで1~24時間加熱することによって得られる。ハロゲン化低級アルキルにおけるハロゲンおよび低級アルキル部分はそれぞれ前記と同義である。

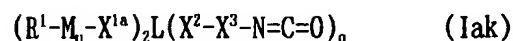
また、化合物 (Iai) は、例えば製造法 1 で得られる化合物 (Iaj) または R^2 がアミノである化合物 (Iad) に、前記同様適当な塩基存在下、5当量~過剰量のジブロモエタンやジブロモプロパン等のジハロゲン化アルキル類を反応させることによって得られる。

さらに、化合物 (Iai) は、例えば前記製造法 1 で示した方法に準じ、あらかじめ L を形成させるために利用する環状ポリオール類等の化合物に1個以上のハロゲン化低級アルキルを導入し、これを用いて該化合物の残りの水酸基またはハロゲン部分にポリアルキレングリコール類Aまたはそのハロゲン化物もしくはトシル化物を2個所置換させる方法によっても得られる。

化合物 (Iai) およびその合成中間体は、前記と同様の方法で任意の純度のものとして単離、精製することができる。

製造法 1 - 6

化合物 (Ia) のうち、 R^2 がイソシアナートである式 (Iak)



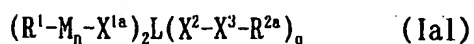
(式中、 R^1 、 L 、 M 、 n 、 q 、 X^{1a} 、 X^2 および X^3 はそれぞれ前記と同義である)で表される化合物は、例えば、化合物 (Iad) をトルエン、テトラヒドロフラン、塩化メチレン等の適当な溶媒中、ホスゲンまたは塩化オキサリルと0~150°Cで1~24

時間反応させるか、 N,N' -カルボニルジイミダゾールと反応させた後に室温で分解させて得られる。

化合物 (Ia) のうち、 R^2 がイソチオシアナートである化合物 (Iap) はホスゲンの代わりにチオホスゲンを用いる以外は上記の方法に従って製造することができる。

製造法 1-7

化合物 (Ia) のうち、 R^2 がスクシンイミドオキシカルボニル、置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニル、ベンゾトリアゾリルオキシカルボニルまたはフタルイミドオキシカルボニルである式 (Ial)

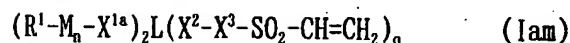


(式中、 R^{2a} はスクシンイミドオキシカルボニル、置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニル、ベンゾトリアゾリルオキシカルボニルまたはフタルイミドオキシカルボニルを表し、 R^1 、 L 、 M 、 n 、 q 、 X^{1a} 、 X^2 および X^3 はそれぞれ前記と同義である) で表される化合物は、通常のエステル合成方法に従って製造することができる。例えば、化合物 (Iaa) 1モルに対し、 N -ヒドロキシスクシンイミド、置換もしくは非置換のヒドロキシアリール、 N -ヒドロキシベンゾトリアゾールまたは N -ヒドロキシフタルイミド1~10モルを、1~10モルの N,N' -ジシクロヘキシルカルボジイミド等の縮合剤存在下、ジメチルホルムアミド、塩化メチレン、ジメチルスルホキシド等の適当な溶媒中、 $-20 \sim 100^\circ\text{C}$ で1~24時間反応させることによって目的物を得ることができる。より詳しくは、A. Fradetら [ポリマー ブルチン (Polym. Bull.)、4巻、205頁 (1981年)]、またはK. Geckelerら [ポリマー ブルチン (Polym. Bull.)、1巻、691頁 (1979年)] によるポリアルキレングリコールの末端にカルボキシル基を導入する方法、カルボキシメチルポリアルキレングリコールの N -ヒドロキシスクシンイミドエステルの製造方法等に準じて得ることができる。

ここで、置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニルは前記と同義である。アリールは前記と同義であり、置換アリールの置換基は、置換アリールオキシカルボニル、置換アリールオキシカルボニルオキシ、置換アリールジスルフィドおよび置換アロイルオキシカルボニルにおける置換基と同義である。

製造法 1-8

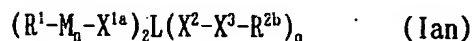
化合物 (Ia) のうち、 R^2 がビニルスルホニルである式 (Iam)



(式中、 R^1 、 L 、 M 、 n 、 q 、 X^{1a} 、 X^2 および X^3 はそれぞれ前記と同義である)で表される化合物は、例えば化合物 (Iaj) を用いて Margherita Morpurgo らの方法 [バイオコンジュゲート ケミストリー (Bioconjugate Chem.)、7巻、363頁 (1996年)] で製造することができる。

製造法 1-9

化合物 (Ia) のうち、 R^2 が置換もしくは非置換の低級アルコキシカルボニルオキシまたは置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニルオキシである式 (Ian)



(式中、 R^{2b} は置換もしくは非置換の低級アルコキシカルボニルオキシまたは置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニルオキシを表し、 R^1 、 L 、 M 、 n 、 q 、 X^{1a} 、 X^2 および X^3 はそれぞれ前記と同義である)で表される化合物は、例えば Talia Miron と Meir Wilchek の方法 [バイオコンジュゲート ケミストリー

(Bioconjugate Chem.)、4巻、568頁 (1993年)] に準じて、 R^2 が水酸基である化合物 (Iaj) と過剰量の *p*-ニトロフェニルクロロホルメート、エチルクロロホルメート等とをジメチルアミノピリジン、トリエチルアミン等の塩基存在下で反応させることで得られる。

また、化合物 (Ian) は、例えば製造法 1 で示した方法に準じ、あらかじめ L を形成させるために利用する環状ポリオール類等の化合物に 1 個所以上の置換もしくは非置換のアルコキシカルボニルオキシまたは置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニルオキシを導入し、これを用いて該化合物の残りの水酸基またはハロゲン部分にポリアルキレングリコール類 A またはそのハロゲン化合物もしくはトシル化物を 2 個所置換させる方法で得ることもできる。

化合物 (Ian) およびその合成中間体は、前記と同様の方法で任意の純度のもので単離、精製することができる。

ここで、置換もしくは非置換の低級アルコキシカルボニルオキシまたは置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニルオキシはそれぞれ前記と同義である。

製造法 2 : X^1 が S である化合物

化合物 (I) のうち、 X^1 が S である化合物 (Ib) は、例えば製造法 1 と同様に、環状ポリオール類を環状ポリハライド類に変換した化合物 [日本化学会編、実験化学講座 第4版、19巻 (1992年)、丸善] または市販の環状ポリハライド類と、ポリアルキレングリコール類 A のチオール誘導体とを、適当な溶媒中、適当な塩基の存在下で反応させることによって得ることができる。

また、化合物 (Ib) は、前記の工程とは逆に、ポリアルキレングリコール類 A のハロゲン化物もしくはトシル化物を環状ポリチオール類と反応させることによっても得ることができる。

ポリアルキレングリコール類 A のチオール誘導体は市販のものを用いるか、Samuel Zalipsky らによってまとめられた方法 [バイオコンジュゲート ケミストリー (Bioconjugate Chem.)、6巻、150頁 (1995年)] で調製できる。

各工程の反応条件、精製条件は製造法 1 に準じる。

製造法 2-1

化合物 (Ib) のうち、 R^2 がカルボキシ、カルバモイル、シアノ、アミノ、マレイミド、ホルミル、ハロゲン化カルボニル、ハロゲン化低級アルキル、イソシアナート、イソチオシアナート、スクシンイミドオキシカルボニル、置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニル、ベンゾトリアゾリルオキシカルボニル、フタルイミドオキシカルボニル、ビニルスルホニル、置換もしくは非置換の低級アルコキシカルボニルオキシまたは置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニルオキシである化合物は、 X^1 が -S- である化合物を製造法 2 に従って製造した後、製造法 1-1 ~ 製造法 1-9 に記載された方法を組み合わせて得ることができる。

製造法 3 : X^1 が NR^3 である化合物

化合物 (I) のうち、 X^1 が NR^3 (式中、 R^3 は前記と同義である) である化合物 (Ic) は、例えば製造法 1 と同様に、環状ポリオール類を環状ポリアミン類に変換した化合物または市販の環状ポリアミン類と、ポリアルキレングリコール類Aのハロゲン化物もしくはトシル化物とを、適当な溶媒中、適当な塩基の存在下で反応させることによって得ることができる。

化合物 (Ic) は、ポリアルキレングリコール類Aのアミノ誘導体を環状ポリハライド類と反応させることによって得ることができる。

また、化合物 (Ic) は環状ポリアルデヒド類1当量と、ポリアルキレングリコール類Aのアミノ誘導体1~10当量とをメタノール、エタノール、ジメチルホルムアミド、アセトニトリル、ジメチルスルホキシド、水、緩衝液等の適当な溶媒に溶解または懸濁し、 $-20\sim 100^{\circ}\text{C}$ で1~100当量のシアノ水素化ホウ素ナトリウムや水素化ホウ素ナトリウム等の還元剤の存在下で反応させることによって得ることができる。

さらに、化合物 (Ic) は、環状ポリアミン類とポリアルキレングリコール類Aのアルデヒド誘導体を用いても製造することができる。

前記環状ポリアルデヒド類としては市販の化合物をそのまま用いるか、環状ポリアルコール類を酸化して用いるか、あるいは環状ポリカルボン酸類を還元して用いればよい。また、ポリアルキレングリコール類Aのアルデヒド誘導体としては市販の化合物を利用できるし、また、ポリアルキレングリコール類Aの末端のアルコールを酸化して用いることもできる。

各工程の反応条件、精製条件は製造法 1 に準じる。

製造法 3-1

化合物 (Ic) のうち、 R^2 がカルボキシ、カルバモイル、シアノ、アミノ、マレイミド、ホルミル、ハロゲン化カルボニル、ハロゲン化低級アルキル、イソシアナート、イソチオシアナート、スクシンイミドオキシカルボニル、置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニル、ベンゾトリアゾリルオキシカルボニル、フタルイミドオキシカルボニル、ビニルスルホニル、置換もしくは非置換の低級アルコキシカルボニルオキシまたは置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニルオキシである化合物は、化合物 (Ic) を製造法 3 に従って合成し

た後、製造法 1-1～製造法 1-9 に記載された方法を組み合わせて製造することができる。

製造法 4 : X^1 が $R^4-NH-C(=O)-R^5$ または $R^6-C(=O)-NH-R^7$ である化合物

化合物 (I) のうち、 X^1 が $R^4-NH-C(=O)-R^5$ (式中、 R^4 および R^5 はそれぞれ前記と同義である) である化合物 (Ida) は、例えばシクロヘキサントリカルボン酸や Kemp's triacid 等から選ばれる環状ポリカルボン酸化合物をペプチド合成法 [泉屋ら、ペプチド合成の基礎と実験 (1985年)、丸善] に従い、N,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド等の適当な溶媒中に溶解または懸濁し、次いで 1～30 当量の N-ヒドロキシスクシンイミド、N-ヒドロキシフタルイミド、N-ヒドロキシベンゾトリアゾール、p-ニトロフェノール等のアルコール体と、1～30 当量の N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロりん酸塩等の縮合剤を加え、さらに 1～3 当量のポリアルキレングリコール類 A のアミノ誘導体を加えて反応させることによって得ることができる。反応は無水条件下、 -20°C ～ 100°C で、1 時間～10 日間攪拌することによって行われる。

また、環状ポリカルボン酸分子中の 1 個以上のカルボキシをメチル、エチル、ベンジル、tert-ブチル等の適当な保護基で保護した後、ポリアルキレングリコール類 A のアミノ誘導体を残りの 2 個のカルボキシに前記の方法で導入し、続いてカルボキシの保護基を通常の脱保護法で除去することによって、 R^2 がカルボキシである 2 本鎖分岐型ポリエチレングリコール誘導体を高純度を含む反応液を得ることもできる。この場合、カルボン酸の保護基の導入や該保護基の除去には通常のペプチドの合成法で用いられる方法 [泉屋ら、ペプチド合成の基礎と実験 (1985年)、丸善] を利用できる。環状ポリカルボン酸類中のカルボキシの配置は、立体配置を含めて何れでもよく、ポリアルキレングリコール類 A のアミノ誘導体としては分子量分布が均一 (好ましくは、 M_w/M_n が 1.1 以下) であればいかなる平均分子量のものを用いてもよい。

また、化合物 (I) のうち、 X^1 が $R^6-C(=O)-NH-R^7$ (式中、 R^6 および R^7 はそれぞれ前記と同義である) である化合物 (Idb) は、前記工程とは逆に、環状ポリアミン類とポリアルキレングリコール類 A のカルボン酸誘導体の活性エステル、ある

いはポリアルキレングリコール類Aの酸ハライド誘導体とを反応させる方法でも得ることができる。ポリアルキレングリコール類Aの酸ハライド誘導体はポリアルキレングリコール類Aのカルボン酸誘導体をハロゲン化チオニルまたはハロゲン化チオニルとトルエン、ジメチルホルムアミド等の適当な混合溶媒中、ピリジン、トリエチルアミン等の適当な触媒存在下で、0～150℃で、1～24時間加熱することによって得ることができる。

各工程の反応条件、精製条件はこれまでの製造法に記載した方法に準じる。

製造法4-1

化合物(1da)および化合物(1db)のうち、R²がカルボキシ、カルバモイル、シアノ、アミノ、マレイミド、ホルミル、ハロゲン化カルボニル、ハロゲン化低級アルキル、イソシアナート、イソチオシアナート、スクシンイミドオキシカルボニル、置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニル、ベンゾトリアゾリルオキシカルボニル、フタルイミドオキシカルボニル、ビニルスルホニル、置換もしくは非置換の低級アルコキシカルボニルオキシまたは置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニルオキシである化合物は、化合物(1da)または化合物(1db)を製造法4に従って合成した後、製造法1-1～製造法1-9に記載された方法を組み合わせて得ることができる。

製造法5：X¹がR⁸-C(=O)-OまたはO-C(=O)-R⁹である化合物

化合物(1)のうち、X¹がR⁸-C(=O)-O(式中、R⁸は前記と同義である)またはO-C(=O)-R⁹(式中、R⁹は前記と同義である)である化合物(1e)は、例えばポリアルキレングリコール類Aと環状ポリカルボン酸類、あるいはポリアルキレングリコール類Aのカルボン酸誘導体と環状ポリオール類の組合わせを用いて、脱水縮合により得ることができる。脱水縮合の方法としては通常のエステル合成で用いられるような、酸または塩基触媒下に脱水する方法か、あるいはジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、アセトニトリル、ピリジン、塩化メチレン等の適当な溶媒中、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド等の縮合剤で対応するアルコール体とカルボン酸を縮合する方法等を利用することができる。さらに、上記工程において酸ハロゲン化物と、対応するアルコール体を反応さ

せることによって目的物を合成できる。

各工程の反応条件、精製条件はこれまでの製造法に記載した方法に準じる。

製造法 5 - 1

化合物 (Ie) のうち、 R^2 がカルボキシ、カルバモイル、シアノ、アミノ、マレイミド、ホルミル、ハロゲン化カルボニル、ハロゲン化低級アルキル、イソシアナート、イソチオシアナート、スクシンイミドオキシカルボニル、置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニル、ベンゾトリアゾリルオキシカルボニル、フタルイミドオキシカルボニル、ビニルスルホニル、置換もしくは非置換の低級アルコキシカルボニルオキシまたは置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニルオキシである化合物は、化合物 (Ie) を製造法 5 に従って合成した後、製造法 1 - 1 ~ 製造法 1 - 9 に記載された方法を組み合わせて得ることができる。

製造法 6 : X' が $R^{6a}-O-C(=O)-NH$ または $R^4-NH-C(=O)-O$ である化合物

化合物 (I) のうち、 X' が $R^{6a}-O-C(=O)-NH$ (式中、 R^{6a} は前記と同義である) である化合物 (Ifa) は、例えば以下のようにして製造することができる。

市販の環状ポリアミン類、または前記製造法を組み合わせる環状ポリオール類より調製した環状ポリアミン類にポリアルキレングリコール類 A のカーボネート誘導体を 1~3 モル過剰に反応させて、化合物 (Ifa) を含む粗生成物が得られる。なお、ポリアルキレングリコール類 A のカーボネート誘導体は、Talia Miron らの方法 [バイオコンジュゲート ケミストリー (Bioconjugate Chem.)、4 巻、568 頁 (1993 年)] に従って製造することができる。また、ポリアルキレングリコール類 A のカーボネート誘導体としては、N-ヒドロキシスクシンイミジルカーボネート、p-ニトロフェニルカーボネート、イミダゾリルカルボニルオキシ誘導体等を利用することができる。

化合物 (I) のうち、 X' が $R^4-NH-C(=O)-O$ (式中、 R^4 は前記と同義である) である化合物 (Ifb) は、例えば以下のようにして製造することができる。

化合物 (Ifb) は環状ポリオール類のカーボネート誘導体とポリアルキレングリコール類 A のアミノ誘導体とを上記と同様に反応させることによって得るこ

とができる。

他の製造法に準じて官能基の保護、脱保護を組み合わせることによって、化合物 (Ifa) または化合物 (Ifb) を選択的に生成させることもできる。

各工程の反応条件、精製条件はこれまでの製造法に記載した方法に準じる。

製造法 6-1

化合物 (If) のうち、 R^2 がカルボキシ、カルバモイル、シアノ、アミノ、マレイミド、ホルミル、ハロゲン化カルボニル、ハロゲン化低級アルキル、イソシアナート、イソチオシアナート、スクシンイミドオキシカルボニル、置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニル、ベンゾトリアゾリルオキシカルボニル、フタルイミドオキシカルボニル、ビニルスルホニル、置換もしくは非置換の低級アルコキシカルボニルオキシまたは置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニルオキシである化合物は、化合物 (If) を製造法 6 に従って合成した後、製造法 1-1～製造法 1-9 に記載された方法を組み合わせて調製することができる。

$R^1-M_n-X^1$ をLに結合して1本鎖化合物を取得し、同様の反応で前記と同一または異なる $R^1-M_n-X^1$ をLに結合して、2本鎖の化合物を取得することもできる。例えば、製造法 1～6 に示した方法のうちいずれかの反応を利用してL中の1個所の官能基にポリアルキレングリコール類を結合させ、1本鎖化合物を得る。生成する1本鎖化合物の割合は、反応に使用するポリアルキレングリコール類と、L部分の構造を構築する原料の比を変えることで調節することができ、1本鎖化合物を主成分にすることも可能である。得られた1本鎖化合物はそのままの純度で、あるいは製造法 1 に示した方法に準じて任意の純度に、あるいは高純度に精製して次のステップに使用することができる。

このようにして得られた1本鎖化合物と、前記と同一または異なるポリアルキレングリコール類を製造法 1～6 に示したいずれかの方法に準じて結合して、2本鎖化合物が調製できる。なお、2本目のポリアルキレングリコール類は1本鎖化合物を取得した反応と同様の反応に付すこともできるが、異なる反応に付し異なる結合様式を有するように調製してもよい。例えば、水酸基、アミノ、カルボキシ等の複数の官能基を有する化合物をL部分の構造を構築する原料に使

用する場合、製造法1に示した方法で X^1 が0である1本鎖化合物をまず取得し、次いで製造法4に示した方法で2本目のポリアルキレングリコール類を X^1 が $R^4-NH-C(=O)-R^5$ となるように反応させることができる。以上のように製造法1～6の組合わせで2つのポリアルキレングリコール類が同一または異なる結合様式でLに結合した2本鎖化合物を得ることができる。さらに、使用するポリアルキレングリコール類は1本目と2本目の分子量が異なってもよく、各々のポリアルキレングリコール類をLに結合させる反応で異なる平均分子量のポリアルキレングリコール類を使用することで容易に目的物が得られる。

また、Lにポリアルキレングリコール類を導入する反応において、L中の1個所以上の官能基（例えば製造法1の場合、1個所以上の水酸基）を残し、他の官能基を適当な保護基で保護してから、ポリアルキレングリコール類と反応、結合させ、その後、保護基を除去することも可能である。

本発明の分岐型ポリアルキレングリコール類は、上記製造法で具体的に示された化合物以外であっても、上記製造法に準じて得ることができる。

なお、先にも述べたとおり、製造法1～6の各工程において、原料に用いるポリアルキレングリコール類は市販のものをを用いることもできるが、Samuel Zalipsky [バイオコンジュゲート ケミストリー (Bioconjugate Chem.)、6巻、150頁 (1995年)] によってまとめられた各種の方法等によって容易に製造することも可能である。

得られた分岐型ポリアルキレングリコール類はシリカゲルクロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、再結晶、抽出等の方法によって、任意の純度の分岐型ポリアルキレングリコール類に精製することができる。

得られた分岐型ポリアルキレングリコール類は前記生理活性ポリペプチドのアミノ酸側鎖、N末端アミノ基またはC末端カルボキシル基に直接、あるいはスパーサーを介して結合させることができる。

スパーサーとしてはアミノ酸やペプチドが好ましいが、ポリアルキレングリコール類を結合することができればそれ以外であってもよい。アミノ酸としてはリジン、システイン等の天然アミノ酸等を用いることができ、オルニチン、ジアミノプロピオン酸、ホモシステイン等を用いることもできる。より好まし

くは、システインがあげられる。ペプチドとしては、アミノ酸残基2~10からなるものが好ましい。アミノ酸、ペプチド以外のスペーサーとしては、グリセロール、エチレングリコール、糖等があげられる。ここで、糖としては、グルコース、ガラクトース、ソルボース、ガラクトサミン、ラクトース等の単糖類や二糖類等があげられる。

これらのスペーサーは、生理活性ポリペプチド分子中のリジン、システイン、アルギニン、ヒスチジン、セリン、スレオニン等の残基の側鎖とアミド結合、チオエーテル結合、エステル結合等を介して結合するか、該ポリペプチドのC末端カルボキシル基とアミド結合やエステル結合するかペプチドのN末端アミノ基とアミド結合する。これらの結合は、通常のペプチド合成法〔泉屋ら、ペプチド合成の基礎と実験（1985年）、丸善〕や遺伝子組換え法を用いて行うことができる。

この場合、生理活性ポリペプチドを合成すると同時にC末端カルボキシル基にスペーサーとなるアミノ酸、ペプチド等を導入することが望ましいが、生理活性ポリペプチドを合成した後にスペーサーを結合してもよい。また、該ポリペプチドのC末端カルボキシル基等を化学合成的に活性化してスペーサーに結合することもできる。また、ポリアルキレングリコール類を予め結合したスペーサーを前記の方法で生理活性ポリペプチドに結合することもできる。

本発明で用いられる生理活性ポリペプチドとしては、ポリペプチド、抗体、およびそれらの誘導体等があげられる。ポリペプチドとしては、例えば、アスパラギナーゼ (Asparaginase)、グルタミナーゼ (Glutaminase)、アルギナーゼ (Arginase)、ウリカーゼ (Uricase)、スーパーオキシドディスムターゼ (Superoxide dismutase)、ラクトフェリン (Lactoferrin)、ストレプトキナーゼ (Streptokinase)、プラスミン (Plasmin)、アデノシンデアミナーゼ (Adenosine deaminase)、プラスミノゲン活性化因子類 (Plasminogen Activator)、プラスミノゲン (Plasminogen) 等の酵素、インターロイキン1~18 (Interleukin-1~18)、インターフェロン- α (Interferon- α)、インターフェロン- β (Interferon- β)、インターフェロン- γ (Interferon- γ)、インターフェロン- ω (Interferon- ω)、インターフェロン- τ (Interferon- τ)、顆粒球コロニー刺激因子 (Granulocyte-Colony Stimulating Factor)、

血小板増加因子 (Thrombopoietin)、エリスロポエチン (Erythropoietin)、腫瘍壊死因子 (Tumor Necrosis Factor)、繊維芽細胞増殖因子1~18 (Fibroblast Growth Factor-1~18)、ミッドカイン (Midkine)、表皮成長因子 (Epidermal Growth Factor)、オステオジェニックプロテイン1 (Osteogenic Protein 1)、幹細胞増殖因子 (Stem Cell Factor)、血管内皮細胞成長因子 (Vascular Endothelial Growth Factor)、形質転換成長因子類 (Transforming Growth Factor)、肝細胞成長因子 (Hepatocyte Growth Factor) 等のサイトカイン、グルカゴン (Glucagon)、パラサイロイドホルモン (Parathyroid Hormone)、グルカゴン様ペプチド類 (Glucagon Like Peptide) 等のホルモン、クローソ蛋白質 (Klotho)、アンジオポエチン (Angiopoietin)、アンジオスタチン (Angiostatin)、レプチン (Leptin)、カルシトニン (Calcitonine)、アミリン (Amylin)、インスリン様成長因子1 (Insulin Like Growth Factor 1)、エンドスタチン (Endostatin) 等があげられる。

本発明で使用する抗体は、公知の手段 [アンティボディーズ ア ラボラトリー マニュアル、コールド スプリング ハーバー ラボラトリー (Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory) (1988年)] を用いてポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体として得ることができる。

本発明で使用する抗体としては、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のいずれも用いることができるが、モノクローナル抗体が好ましい。

本発明のモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマが産生する抗体、ヒト化抗体、およびそれらの抗体断片等があげられる。

ヒト化抗体としては、ヒト型キメラ抗体、ヒト型CDR移植抗体等があげられる。

ヒト型キメラ抗体は、ヒト以外の動物の抗体重鎖可変領域 (以下、重鎖はH鎖として、可変領域はV領域としてHVまたはVHとも称す) および軽鎖可変領域 (以下、軽鎖はL鎖としてLVまたはVLとも称す) とヒト抗体の重鎖定常領域 (以下、定常領域はC領域としてCHとも称す) およびヒト抗体の軽鎖定常領域 (以下、CLとも称す) とからなる抗体を意味する。ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ラビット等、ハイブリドーマ細胞を作製することが可能であればいかなるものも用いることができる。

ヒト型CDR移植抗体は、ヒト以外の動物の抗体のH鎖、L鎖のV領域のCDRのアミノ酸配列をヒトの抗体のH鎖、L鎖のV領域の適切な位置に移植した抗体を意味する。

抗体断片としては、Fab、Fab'、F(ab')₂、一本鎖抗体、ジスルフィド安定化V領域断片、相補性決定領域を含むペプチド等があげられる。

Fabは、IgGのヒンジ領域で2本のH鎖を架橋している2つのジスルフィド結合の上部のペプチド部分を酵素ババインで分解して得られた、H鎖のN末端側約半分とL鎖全体で構成された、分子量約5万の抗原結合活性を有するフラグメントである。

Fab'は、上記F(ab')₂のヒンジ間のジスルフィド結合を切断した分子量約5万の抗原結合活性を有するフラグメントである。

F(ab')₂は、IgGのヒンジ領域の2個のジスルフィド結合の下部を酵素トリプシンで分解して得られた、2つのFab領域がヒンジ部分で結合して構成された、分子量約10万の抗原結合活性を有するフラグメントである。

一本鎖抗体（以下、scFvとも称す）は、一本のVHと一本のVLとを適当なペプチドリンカー（以下、Pと称す）を用いて連結した、VH-P-VLないしはVL-P-VHポリペプチドを示す。本発明で使用されるscFvに含まれるVHおよびVLとしては、本発明のモノクローナル抗体あるいはヒト型CDR移植抗体のいずれをも用いることができる。

ジスルフィド安定化V領域断片（以下、dsFvとも称す）は、VHおよびVL中のそれぞれ1アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドをジスルフィド結合を介して結合させたものをいう。システイン残基に置換するアミノ酸残基はReiterらにより示された方法【プロテイン エンジニアリング(Protein Engineering)、7巻、697頁（1994年）】に従って、抗体の立体構造予測に基づいて選択することができる。本発明のジスルフィド安定化抗体に含まれるVHあるいはVLとしてはモノクローナル抗体あるいはヒト型CDR移植抗体のいずれをも用いることができる。

生理活性ポリペプチドの誘導体としては、アミノ酸置換体、アミノ酸欠失体、糖鎖付加体、糖鎖欠失体、部分ペプチド等があげられる。

上記の生理活性ポリペプチドとしては、酵素、サイトカイン、ホルモン等が

好ましい。より好ましくはインターフェロン- β 、インターフェロン- α 、インターフェロン- γ 等のインターフェロン類、顆粒球コロニー刺激因子、スーパーオキシドディスムターゼ等があげられる。それらの化学修飾ポリペプチドも好ましい。

上記の生理活性ポリペプチドを化学修飾した化学修飾ポリペプチドとしては、インターフェロン類を化学修飾した化学修飾ポリペプチドが好ましく、この化学修飾ポリペプチドを含有する医薬も好ましい。また、インターフェロン類を化学修飾した化学修飾ポリペプチドを含有する医薬としては、インターフェロン類を化学修飾した化学修飾ポリペプチドを含有する多発性硬化症治療薬、肝炎治療薬、血管新生が関与する疾患の治療薬、悪性腫瘍治療薬、眼疾患治療薬、皮膚疾患治療薬等があげられるが、好ましいのは多発性硬化症治療薬である。

これらの生理活性ポリペプチドは動物臓器や組織から抽出する方法でも得られるが、通常のアミノ酸合成法、あるいは遺伝子組換え法で製造することによっても得ることができる。さらに、市販のポリペプチドも用いることができる。

また、反応に使用する該ポリペプチドとしては粗精製物を用いることができ、またゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、抽出等の精製法により化学修飾に適した純度に精製したものをを用いることもできる。

該ポリペプチドはリン酸緩衝液、ほう酸緩衝液、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液等の緩衝液もしくは水、またはN,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、ジオキサン、テトラヒドロフラン等の適当な有機溶媒中、あるいはこれらの有機溶媒と水溶液との混合溶媒中で製造され、化学修飾反応に用いられる。

本発明の分岐型ポリアルキレングリコール類は、ポリペプチド、さらに詳細にはそして好ましくは、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、エリスロポエチン、インターフェロン、インターロイキン等の遊離システイン残基を有するあらゆる天然型または遺伝子組換え型のポリペプチドの共有結合による部位特異的修飾にも使用することができる。

本発明の分岐型ポリアルキレングリコール類で修飾された生理活性ポリペプチドの製造は、分岐型ポリアルキレングリコール類を生理活性ポリペプチド 1

モルあたり1~1000モル程度、好ましくは1~50モル程度用いて反応させることによって行われる。分岐型ポリアルキレングリコール類の生理活性ポリペプチドへの修飾の度合いは生理活性ポリペプチドに対する分岐型ポリアルキレングリコール類のモル比、反応温度、pH、反応時間等を調節することによって、任意に選択することができる。また、反応に使用する溶媒は反応を妨害しないものであればいずれでもよく、例えばリン酸緩衝液、ほう酸緩衝液、トリス塩酸緩衝液、炭酸水素ナトリウム水溶液、酢酸ナトリウム緩衝液、N,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、メタノール、アセトニトリル、ジオキサン等、あらゆるものから選択することができる。反応の温度、pHおよび時間は生理活性ポリペプチドの活性が損なわれない条件であればいずれでもよく、例えば0~50℃、10分~100時間、pH4~10が好ましい。

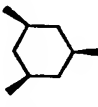
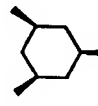
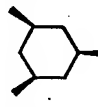
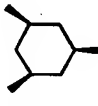
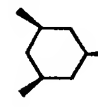
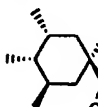
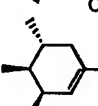
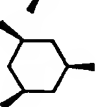
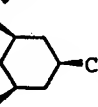
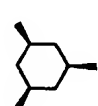
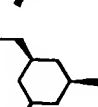
本発明の分岐型ポリアルキレングリコール類で修飾された生理活性ポリペプチドの精製は常法に従って、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、逆相高速液体クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、限外濾過等により行うことができる。合成または精製された生理活性ポリペプチドまたは分岐型ポリアルキレングリコール類で修飾された該生理活性ポリペプチドが該ポリペプチドの構造を有するものであることの確認は、質量分析、核磁気共鳴(NMR) およびアミノ酸分析計によるアミノ酸組成分析により、また気相プロテインシーケンサーによりエドマン分解して得られたフェニルチオヒダントイン(PTH)アミノ酸を逆相HPLCで分析することによるアミノ酸配列分析等により行うことができる。

本発明の化学修飾ポリペプチドは人間または動物用の薬剤組成物の形態で投与することができ、該組成物は通常の薬剤製造法によって製造することができる。

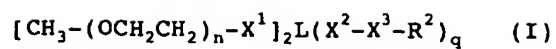
投与方法としては経口、静脈内、皮下、筋肉下、腹腔内、経皮投与または他の許容される方法等が可能であり、投与に適する組成物を用いることができる。これらの剤形には通常用いられる等張化剤、緩衝剤、賦形剤、pH調整剤、安定化剤、防腐剤、溶解剤、湿潤剤、乳化剤、滑沢剤、甘味剤、着色剤、酸化防止剤等の慣用の添加剤を添加して用いることができる。









化合物(I)の具体例を第1表に示す。

第1表(1)

$[\text{CH}_3-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{X}^1]_2\text{L}(\text{X}^2-\text{X}^3-\text{R}^2)_q \quad (\text{I})$				
化合物番号 略号	X^1	q	L	$\text{X}^2-\text{X}^3-\text{R}^2$
1 5CHTO(2UU)	$-\text{CH}_2-\text{N}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-$	1		$-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{N}-\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2$
2 5CHTC(2AA)	$-\text{CH}_2-\text{N}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-$	1		$-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OH}$
3 5CHTO(2EA)	$-\text{O}-$	1		$-\text{O}-(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$
4 5CHTM(2EA)	$-\text{O}-\text{CH}_2-$	1		$-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$
5 5CHTM(2EU)	$-\text{O}-\text{CH}_2-$	1		$-\text{H}_2\text{C}-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{N}-\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2$
6 5QNA(2UA)	$-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-$	2		$-(\text{OH})_2$
7 5SKA(2UA)	$-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-$	1		$-\text{OH}$
8 5CHTM(2URa)	$-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{CH}_2-$	1		$-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}\text{H}$
9 5CHTM(2UM)	$-\text{CH}_2-\text{N}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{CH}_2-$	1		$-\text{CH}_2-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-\text{C}_4\text{H}_8-\text{N}-\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2$
10 5CHTM(2EA2)	$-\text{O}-\text{CH}_2-$	1		$-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{COOH}$
37 5CHTM(2UA)	$-\text{CH}_2-\text{N}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-$	1		$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{COOH}$

第1表(2)



化合物番号	X^1	q	L	$\text{X}^2-\text{X}^3-\text{R}^2$
11	-O-	1		$-\text{O}-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$
12	-O-CH ₂ -	1		$-\text{CH}_2-\text{OH}$
13	-O-CH ₂ -	1		$-\text{C}(=\text{O})\text{H}$
14	-O-	1		$-\text{O}-(\text{CH}_2)_2\text{C}(=\text{O})\text{Cl}$
15	-O-CH ₂ -	1		$-\text{CH}_2-\text{Br}$
16	-O-	1		$-\text{O}-(\text{CH}_2)_3\text{N}=\text{C}=\text{O}$
17	$-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{N}(\text{H})-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-$	1		$-\text{O}-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$
18	$-\text{CH}_2-\overset{\text{H}}{\underset{\text{O}}{\parallel}}\text{N}-\text{C}-$	1		$-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$

以下に、生理活性ポリペプチドおよび化学修飾ポリペプチドの活性について説明する。

試験例 1 化学修飾インターフェロン- β の抗ウイルス活性

実施例 1 1～実施例 1 5 および実施例 3 3 で得られた化学修飾rhIFN- β および化学修飾天然型hIFN- β 、未修飾rhIFN- β 、ならびに未修飾天然型hIFN- β の抗ウイルス活性を下記のニュートラルレッド (NR) 取り込み法で調べた。

<NR取り込み法>

小長谷らの方法 [蛋白質核酸酵素 (別冊)、355頁 (1981年)] を参考に抗ウイルス活性を測定した。

すなわち、滅菌したトランスファープレートに5%ウシ胎児血清 (FBS) 添加イーグルMEM培地を添加した。次に、IFN国内標準品 [α (ミドリ十字) および β (東レ)] 溶液を各々50 μ lずつウェルに分注し、2倍ずつの段階希釈を行った。一方、所定の濃度に培地で調製した化学修飾IFNまたは未修飾IFN溶液も同様に50 μ lずつウェルに分注した。これらの溶液を、所定の細胞数のヒト羊膜由来の株化細胞 (FL細胞) を入れた96穴プレートにトランスし、数秒間攪拌した。37°Cで一昼夜、CO₂インキュベーターで培養し、抗ウイルス状態を作った。

次に、培養液を除去した後、ウイルス溶液を添加し、37°Cで2日間、CO₂インキュベーターで培養してウイルスを感染させた。IFNにより細胞の抗ウイルス状態が変化し、細胞変性が起こった。続いて、培養液を除去し、NR溶液を添加した。37°Cで1時間、CO₂インキュベーターに放置し、NR溶液を除去した。等張りりん酸緩衝液でウェルを洗浄し、抽出液 (0.01mol/L塩酸-30%エタノール) を添加し、2～3分間攪拌した。

NRにより生き残った細胞を染色し、抽出後、492nmでの吸光度を測定し、定量曲線をプロットした。定量曲線より算出した未修飾IFNの活性を100%としたときの化学修飾IFNの相対活性を算出した。

各IFN- β の比活性を第2表、第3表および第4表に示す。

第2表 化学修飾組換え型 hIFN- β の抗ウイルス活性

化合物略号	実施例	相対活性(%)
未修飾 rhIFN- β	—	100
5CHTO(2UU)-rhIFN- β	11	96
5CHTC(2AA)-rhIFN- β	12	122
5CHTO(2EA)-rhIFN- β	13	90
5CHTM(2EA)-rhIFN- β	14	116

第3表 化学修飾天然型 hIFN- β の抗ウイルス活性

化合物略号	実施例	相対活性(%)
未修飾天然型 hIFN- β	—	100
5CHTM(2EA)-天然型 hIFN- β	15	104

第4表 化学修飾組換えヒト 17 Ser IFN- β の抗ウイルス活性

化合物略号	実施例	相対活性(%)
未修飾 17 Ser rhIFN- β	—	100
5CHTM(2EA)- 17 Ser rhIFN- β	33	70

本件の化学修飾rhIFN- β はいずれも抗ウイルス活性を保持していることが確認された。

試験例2 化学修飾インターフェロン- α の抗ウイルス活性

実施例16および実施例17で得られた化学修飾rhIFN- α 、および未修飾rhIFN- α の抗ウイルス活性を試験例1に示したNR取り込み法で調べた。

各IFN- α を濃度1 μ g/mlで作用させたときの活性を第5表に示す(未修飾IFN- α の活性を100%として表示した)。

第5表 化学修飾 IFN- α の抗ウイルス活性

化合物略号	実施例	濃度(μ g/ml)	相対活性(%)
5CHTC(2AA)-rhIFN- α	16	1	100
5CHTM(2EA)-rhIFN- α	17	1	100
未修飾 rhIFN- α	—	1	100

化学修飾rhIFN- α はいずれも抗ウイルス活性を保持していることが確認された。

試験例3 化学修飾組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子誘導体のマウス白血病細胞NFS60に対する増殖促進作用

実施例20～実施例23、実施例25および実施例26の化合物、未修飾rhG-CSF誘導体および未修飾rhG-CSFのマウス白血病細胞NFS60 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA、82巻、6687頁(1985年)] に対する増殖促進活性を、浅野らの方法 [薬理と治療、19巻、2767頁(1991年)] に従って測定した。

各化合物を100ng/mlの濃度で細胞に作用させたときの結果を未修飾のポリペプチドの活性を100として第6表および第7表に示す。

第6表 化学修飾 rhG-CSF 誘導体の NFS60 細胞増殖促進活性

化合物略号	実施例	濃度(ng/ml)	相対活性(%)
未修飾 rhG-CSF 誘導体	—	100	100
5CHTO(2UU)-rhG-CSF 誘導体	20	100	100
5CHTC(2AA)-rhG-CSF 誘導体	21	100	100
5CHTO(2EA)-rhG-CSF 誘導体	22	100	100
5CHTM(2EA)-rhG-CSF 誘導体	23	100	100

第7表 化学修飾 rhG-CSF の NFS60 細胞増殖促進活性

化合物略号	実施例	濃度(ng/ml)	相対活性(%)
未修飾 rhG-CSF	—	100	100
5CHTM(2EA)-rhG-CSF	25	100	100
5CHTC(2AA)-rhG-CSF	26	100	100

試験例4 化学修飾スーパーオキシドディスムターゼの酵素活性

実施例27、実施例30～実施例32および実施例34で調製した化学修飾SODの酵素活性をMccord, J. M.とFridovich, Iのキサンチン-キサンチンオキシダーゼ-シクロクロムC系 [ザ ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (J. Biol. Chem.)、244巻、6049頁(1969年)] で測定した。SOD活性1ユ

ニット (U) とは、pH7.8、30℃下で、シトクロム C の還元速度を 50% 阻害する SOD の酵素量を示し、以下の式で算出した。

$$\text{比活性 (U/mg)} = \left(\frac{\text{ブランク}}{\Delta A / \text{分}} - 1 \right) \times \frac{1}{0.000256}$$

化学修飾ウシ SOD、および化学修飾ヒト SOD の酵素活性を各々第 8 表、第 9 表に示す。

SOD 50U/ml=0.000256mg (3900U/mg の場合)

$\Delta A / \text{分}$: 測定値

第 8 表 化学修飾ウシ Cu,Zn 型

スーパーオキシドディスムターゼの酵素活性

化合物略号	実施例	相対活性 (%)
未修飾 bSOD	—	100
5CHTC(2AA)-bSOD	27	72
5CHTM(2EA)-bSOD	30	90
5CHTM(2EA)-bSOD (精製品)	31	114

※活性は未修飾ウシ SOD の酵素活性を 100% とした相対活性で表示した。

第 9 表 化学修飾ヒト Cu,Zn 型

スーパーオキシドディスムターゼの酵素活性

化合物略号	実施例	相対活性 (%)
未修飾 hSOD	—	100
5CHTM(2EA)-hSOD	32	101
5CHTM(2UM)-hSOD	34	92

※活性は未修飾ヒト SOD の酵素活性を 100% とした相対活性で表示した。

試験例 5 化学修飾インターフェロン- β の血中半減期延長効果

実施例 1 1 で得られた 5CHT0(2UU)-rhIFN- β 、実施例 1 2 で得られた 5CHTC(2AA)-rhIFN- β 、実施例 1 4 で得られた 5CHTM(2EA)-rhIFN- β 、参考例 2 で得られた 10SCM-rhIFN- β および参考例 6 で得られた未修飾 rhIFN- β を等張リン

酸緩衝液 (PBS) で $12.5 \mu\text{g/ml}$ の濃度に調製し、8～10週齢のBALB/C雄性マウス (日本チャールズリバー) に $200 \mu\text{l}$ ずつ静脈内注射した。経時的にマウスを殺し血清を採取し、ELISA法 (酵素免疫測定法、Enzyme-linked Immunosorbent Assay) により血中のIFN- β の濃度を算出した。

その結果を図1に示す。

未修飾IFN- β が投与後1時間で検出限界以下になったのに対し、化学修飾IFN- β では数時間後も血中濃度が維持され、大幅な持続性が付与された。

また、本発明で開示された化合物、すなわち平均分子量約10,000の分岐型ポリエチレングリコールで修飾されたrhIFN- β は、平均分子量10,000の直鎖型ポリエチレングリコールで修飾されたrhIFN- β に比較してより血中持続性に優れていることが分かった。

試験例6 化学修飾rhG-CSF類の血中半減期延長効果

実施例23、実施例25および参考例3で得られる化学修飾体、ならびに参考例5および参考例9で得られる未修飾体を雄性ラットに 0.1mg/kg の投与量で静脈内注射し、24時間後に尾静脈より血液を採取し、適宜希釈し、ELISAにて血中の化合物濃度を測定した。2回の実験の平均値を第10表に示す。

第10表 化学修飾 rhG-CSF 類の血中半減期延長効果

化合物名	実施例	24 時間後血中濃度 (ng/mL)
5CHTM(2EA)-rhG-CSF 誘導体	23	105
5CHTM(2EA)-rhG-CSF	25	269
10SCM-rhG-CSF 誘導体	参考例 3	72
rhG-CSF 誘導体	参考例 5	検出限界以下
rhG-CSF	参考例 9	検出限界以下

未修飾体が24時間後に検出限界以下になったのに対し、化学修飾rhG-CSFおよび化学修飾rhG-CSF誘導体では血中濃度が維持され、大幅な血中持続性が付与された。

また、本発明で開示された化合物、すなわち、平均分子量10,000の分岐型ポリエチレングリコールで修飾されたrhG-CSFおよび同rhG-CSF誘導体は、平均分

子量10,000の直鎖型ポリエチレングリコールで修飾されたrhG-CSF誘導体に比較してより血中持続性に優れていることが分かった。

試験例7 化学修飾rhIFN- β の電気泳動による分子サイズの比較

実施例11および実施例14で得られた2本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾rhIFN- β 、および参考例2で得られた直鎖型ポリエチレングリコール修飾rhIFN- β のSDS-PAGEを行い、得られた乾燥ゲルを用いて各成分の見かけの分子量を分子量マーカーより算出した。各化学修飾rhIFN- β の電気泳動により得られた見かけの分子量の一例を第11表に示す。

第11表 化学修飾rhIFN- β のSDS-PAGEで算出した見かけの分子量

修飾試薬略号	5CHTO(2UU)	5CHTM(2EA)	10SCM
参照実施例	11	14	参考例2
1分子結合体の分子量*	40.8kDa	44.6kDa	36.6kDa
2分子結合体の分子量*	66.5kDa	75.6kDa	64.5kDa

*: PDI スキャナー (Howtek, Inc. 製、Model SM3) を用い分子量マーカーの検量線より算出した見かけの分子量。検量線の分子量標準品としてLysozyme (14,400)、Trypsin inhibitor (21,500)、Carbonic anhydrase (31,000)、Ovalbumin (45,000)、Serum albumin (66,200) およびPhosphorylase b (97,400) を用いた。

直鎖型ポリエチレングリコール修飾体に比較して、分岐型ポリエチレングリコール修飾体は分子量がほぼ同じであるのに対し、電気泳動上の見かけの分子量は増大したことから、分子サイズが大きいことが示された。

試験例8 化学修飾rhG-CSF誘導体の電気泳動による分子サイズの比較

実施例21および実施例23で得られた2本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾rhG-CSF誘導体、および参考例3で得られた直鎖型ポリエチレングリコール修飾rhG-CSF誘導体のSDS-PAGEを行い、得られた乾燥ゲルを用いて各成分の見かけの分子量を分子量マーカーより算出した。各化学修飾rhG-CSF誘導体の電気泳動により得られた見かけの分子量の一例を第12表に示す。

第12表 化学修飾 rhG-CSF 誘導体の SDS-PAGE
で算出した見かけの分子量

修飾試薬略号	5CHTC(2AA)	5CHTM(2EA)	10SCM
参照実施例	21	23	参考例3
1分子結合体の分子量*	45.1kDa	48.0kDa	33.3kDa
2分子結合体の分子量*	76.1kDa	80.1kDa	60.4kDa

*: PDI スキャナー (Howtek, Inc. 製、Model SM3) を用い分子量マーカーの検量線より算出した見かけの分子量。検量線の分子量標準品として Lysozyme (14,400)、Trypsin inhibitor (21,500)、Carbonic anhydrase (31,000)、Ovalbumin (45,000)、Serum albumin (66,200)、Phosphorylase b (97,400) を用いた。

直鎖型ポリエチレングリコール修飾体に比較して、分岐型ポリエチレングリコール修飾体は分子量がほぼ同じであるのに対し、電気泳動上の見かけの分子量は増大したことから、分子サイズが大きいことが示された。

試験例9 化学修飾SODの電気泳動による分子サイズの比較

実施例27および実施例30で得られた2本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾SOD、および参考例4で得られた直鎖型ポリエチレングリコール修飾SODのSDS-PAGEを行い、得られた乾燥ゲルを用いて各成分の見かけの分子量を分子量マーカーより算出した。各化学修飾SODの電気泳動により得られた見かけの分子量の一例を第13表に示す。

第13表 化学修飾SODのSDS-PAGEで算出した見かけの分子量

修飾試薬略号	5CHTC(2AA)	5CHTM(2EA)	10SCM
参照実施例	27	30	参考例4
1分子結合体の分子量*	41.4kDa	45.7kDa	36.3kDa
2分子結合体の分子量*	66.7kDa	81.5kDa	62.1kDa

*: PDIスキャナー (Howtek, Inc.製、Model SM3) を用い分子量マーカの検量線より算出した見かけの分子量。検量線の分子量標準品としてLysozyme (14,400)、Trypsin inhibitor (21,500)、Carbonic anhydrase (31,000)、Ovalbumin (45,000)、Serum albumin (66,200) およびPhosphorylase b (97,400) を用いた。

直鎖型ポリエチレングリコール修飾体に比較して、分岐型ポリエチレングリコール修飾体は分子量がほぼ同じであるのに対し、電気泳動上の見かけの分子量は増大したことから、分子サイズが大きいことが示された。

試験例10 光散乱測定による従来型の2本鎖分岐型PEG誘導体との分子サイズの比較

実施例10で得られた本発明の2本鎖分岐型ポリエチレングリコール誘導体 [5CHTM(2EA2)] と参考例8で得られた従来型2本鎖分岐型ポリエチレングリコール誘導体 (5PEG₂GABA) の水溶液中での分子サイズの比較を、光散乱光度計を用いて下記の条件で測定した。

<測定条件>

光散乱光度計: DLS-7000 (大塚電子)

示差屈折計: DRM-1021 (大塚電子)

光源: アルゴンレーザー75mW (632.8nm)

測定温度: 25°C

緩衝液: 等張りん酸緩衝液

試料濃度: 1.4mg/ml~3.3mg/ml

前処理: 0.22μmフィルター濾過

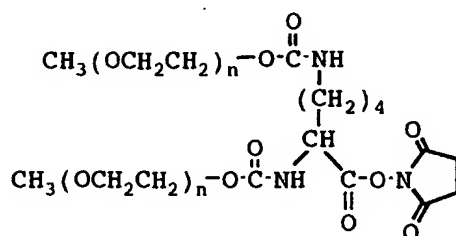
この結果、実施例10の化合物は参考例8の化合物に比べて、約1.9倍の慣性二乗半径を有することが示唆された。従来型の平面構造のトリアジン環を介し

て分岐させたポリエチレングリコール誘導体に比べ、シクロヘキサンに結合したポリエチレングリコール鎖が水溶液中でより広がりを持った状態にあることを示しており、同一分子量でありながら本件のポリアルキレングリコール類の方が分子量増大効果に優れていることが示された。

試験例 11・従来型2本鎖分岐型ポリエチレングリコール誘導体との化学修飾体への変換率の比較

本発明の2本鎖分岐型ポリエチレングリコール誘導体としては実施例10で得られた化合物5CHTM(2EA2)を実施例36と同様の方法でNHSエステルに変換したものを使用した。

比較には、平均分子量10,000の下記式で表される従来型のポリエチレングリコール誘導体PEG2-NHS [リジン誘導体、略号：5LYS(2UA)、Shearwater Polymers, Inc.製]



を用いた。

50mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7) で調製した3.68mg/mlの参考例5で得られる rhG-CSF誘導体に、NHSエステルを蛋白質1mgあたり1.6、2.7、3.8、4.8または5.8mg 加え、4°Cで反応した。20分後の反応液を実施例11と同様TSK gel G-4000SW_{XL} カラムを用いたゲル濾過HPLCで分析した。得られたクロマトグラムのピーク面積より化学修飾体への変換率を算出した。

結果を第 14 表に示す。

第14表 G-CSF 誘導体の化学修飾体への変換率 (%)

化合物略号	修飾体生成量 (%)				
	蛋白質 1mg 当たりの試薬量 (mg)				
	1.6	2.7	3.8	4.8	5.8
5CHTM(2EA2)	34.0	48.6	56.1	55.6	63.8
5LYS(2UA)	26.5	36.6	38.2	39.7	46.2

第14表から、従来型の2本鎖分岐型ポリエチレングリコール誘導体に比べ、本発明の2本鎖分岐型ポリアルキレングリコール類はタンパク質がより安定な中性条件で、蛋白質をより多く化学修飾体に変換できることが確認された。

試験例12 水溶液中における従来型の2本鎖分岐型ポリエチレングリコール誘導体との安定性の比較

実施例10で得られた本発明の2本鎖分岐型ポリエチレングリコール誘導体 [5CHTM(2EA2)] を使用した。比較には、平均分子量10,000の従来型ポリエチレングリコール誘導体PEG2-NHS [リジン誘導体、略号: 5LYS(2UA)、Shearwater polymers, Inc. 製] の末端カルボン酸タイプを使用した。

両者の安定性を以下の手順で評価した。

中性 (50mmol/Lりん酸緩衝液 pH 7.5) およびアルカリ性 (50mmol/Lほう酸緩衝液 pH 10.0) の緩衝液を用いて、両試薬を 2mg/ml になるように調製し、調製した水溶液を37°Cで静置した。溶液調製直後から経時的にサンプリングし、1mol/Lりん酸緩衝液pH 7.5を加えて中性にした後、電気泳動で両試薬のバンド (10kDa) および分解物を比較した。

その結果、5LYS(2UA)は中性では安定であったが、アルカリ条件下で経時的に1本鎖のバンド (5kDa) が検出され、次第に鮮明になることが確認された。一方、5CHTM(2EA2)では中性条件下、アルカリ条件下のサンプルともに1ヶ月間分解物が全く検出されなかった。

以上の結果は、従来型の2本鎖分岐型PEG試薬5LYS(2UA)ではアルカリ性の条件下で2本鎖から1本鎖への分解が生じ得ることを示している。一般に蛋白質のポリエチレングリコール修飾はpH8からpH11程度のアルカリ性条件下で実施され

ることが多く、5LYS(2UA)を用いた場合には化学修飾反応中に修飾剤が分解を起こす可能性が示唆された。

<電気泳動条件>

ゲル：NuPAGE4-12% (NOVEX製)

染色：0.1mol/Lヨウ素水溶液

分子量マーカー：PEG5000、PEG10000、PEG20000 (日本油脂製)

試験例 1 3 化学修飾抗GD3キメラ抗体のガングリオキシドGD3に対する結合活性

実施例 3 9 で調製した化学修飾KM-871の結合活性をKenya.Sらの方法 [キャンサー イムノロジー イムノセラピー (Cancer Immunol. Immunother.)、36巻、373-380頁 (1993年)] に基づいて測定した。

その結果、未修飾KM-871のガングリオキシドGD3に対する結合活性を100%とした場合、化学修飾KM-871では約20%のガングリオキシドGD3に対する結合活性が残存していることを確認した。

試験例 1 4 従来型2本鎖分岐型ポリエチレングリコール誘導体との化学修飾体への変換率の比較

本発明の2本鎖分岐型ポリエチレングリコール誘導体としては実施例10で得られた化合物5CHTM(2EA2)を実施例36と同様の方法でNHSエステルに変換したものを使用した。

比較には、試験例11と同様に平均分子量10,000の従来型ポリエチレングリコール誘導体PEG2-NHS (Shearwater Polymers, Inc. 製) を用いた。

50mmol/Lリン酸緩衝液(pH6)で調製した2.0mg/mlのウシCu,Zn型スーパーオキシドディスムターゼおよびウシ血清アルブミン (BSA) に、前記ポリエチレングリコール誘導体のNHSエステルを蛋白質1モルに対して50モル加え、4°Cで15時間反応した。その後、反応液を実施例11と同様TSK gel G-4000SW_{HL}カラムを用いたゲル濾過HPLCで分析した。得られたクロマトグラムのピーク面積より化学修飾体への変換率を算出した。

結果を第15表に示す。

第15表 bSOD および BSA の化学修飾体への変換率 (%)

化合物略号	化学修飾体生成量 (%)	
	bSOD	BSA
5CHTM(2EA2)	71.2	34.5
5LYS(2UA)	29.7	10.7

第15表から、従来型の2本鎖分岐型ポリエチレングリコール誘導体に比べ、本発明の2本鎖分岐型ポリアルキレングリコール類はタンパク質がより安定な中性条件で、化学修飾体への高い変換率を示すことが確認された。

試験例15 モルモットEAEモデルにおける化学修飾インターフェロン- β と未修飾インターフェロン- β との活性の比較

多発性硬化症の動物モデルとして、実験的自己免疫性脳脊髄炎(Experimental Autoimmune Encephalomyelitis、以後EAEと略す)が広く用いられている(ジャーナル オブ ニューロパソロジー アンド イクスペリメンタル ニューロロジー (Journal of Neuropathology & Experimental Neurology)、57巻、602-614頁(1998年))。このモデルにおいて、動物は全脊髄成分あるいはミエリン構成成分の蛋白質をアジュバントと共に感作されることにより、急性あるいは再発性の麻痺を示し、組織学的解析においては、多発性硬化症で見られるような中枢神経系のT細胞浸潤、脱髄病変を呈する。また細胞移入等の結果より、中枢神経ミエリン構成蛋白質に特異的に反応するCD4⁺T細胞が病態形成において重要な役割を担っていることも明らかになっている(クリニカル ニューロサイエンス (Clinical Neuroscience)、15巻、23-27頁(1997年))。さらに、モルモットのEAEにおいてヒトIFN- β が有効性を示すことが報告されており(第72回日本薬理学会年会プログラム、292P、P-684、1999年)、モルモットEAEモデルはヒトIFN- β の薬効評価系として有用であると考えられている。

<使用動物>

Hartley系モルモット(メス、SPF、3週齢、日本エスエルシー、引佐生育所、浜松市)を購入し、恒温(22 ± 3℃)、恒湿(50 ± 20%)の条件下の動物室で1週間飼育後、使用した。

<エマルジョン調製>

a) Fresh guinea pig central nervous system (CNS)ホモジネートの調製:

ネンブータル麻酔下でモルモットのCNSを回収し、CNS湿重量1gにつき1 mL の生理食塩水 (大塚製薬、東京)を加えた。この溶液をポリトロン(KINEMATICA、Switzerland)を用いて90秒間ホモジネートし、CNS原液とした。この液を生理食塩水で4倍希釈し、使用した。

b) Mycobacterium tuberculosis H37Ra (以下H37Raと表記):

H37Ra(Difco、Detroit、MI、U.S.A.)をめのう乳鉢で粉碎し、Incomplete Freund Adjuvant (IFA、Difco、MI、U.S.A.)に2.5 mg/mLの濃度になる様に懸濁した。等量のa)とb)を混合し、ポリトロンを用いて完全にエマルジョン化した。

<薬物および調製方法>

使用した薬物とその投与量を以下に記す。

ヒトIFN- β (IFN- β): 2.4 Million International Units (MIU) /kg

PEG化ヒトIFN- β (PEG-IFN- β): 2.4 MIU/kg

PEG-IFN- β は、IFN- β を用いて、後記の実施例14の方法に準じて製造した。IFN- β とPEG-IFN- β の投与用量は、藪内らの報告を参考にした(第72回日本薬理学会プログラム、292P、P-684、1999)。IFN- β およびPEG-IFN- β としては、それぞれ95.5 MIU/mL、109.04 MIU/mLの濃度で60%エチレングリコール(関東化学、東京)、50 mmol/Lりん酸緩衝液(pH 6)(KH_2PO_4 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、和光純薬、大阪)、1 mol/L塩化ナトリウム(和光純薬)溶液に溶解した状態のものを用いた。各薬物は、投与直前にりん酸緩衝生理食塩水(PBS、Dulbecco's phosphate buffered saline without magnesium and calcium (ICN Biomedicals, CA, U.S.A.))に2.4 MIU/mLとなるように、かつ含有溶媒量が等量になるよう希釈した。

<投与方法>

それぞれの薬物はday 0からday 20まで、1日1回モルモット背部皮下に投与した。

<群分けおよび感作>

モルモットの体重を測定し、各群の平均体重がほぼ等しくなるように群分けした後、エーテル麻酔下でモルモットの頸部に前述のエマルジョンを200 mLずつ3個所に(600 mL/body)皮内投与した(Normal群には感作および薬物投与のい

ずれも施さなかった)。以下にグループ1～4について示す。

グループ1 (Normal群) は「感作なし、薬物投与なし」

グループ2 (Vehicle Control群) は「感作あり、60%エチレングリコール、50 mmol/Lりん酸緩衝液 (pH 6)、1 mol/L 塩化ナトリウム溶液をPBSで希釈した溶液を投与」。

グループ3 (IFN- β 投与群) は「感作あり、IFN- β (2.4 MIU/kg)投与」

グループ4 (PEG-IFN- β 投与群) は「感作あり、PEG-IFN- β (2.4 MIU/kg)投与」。

感作当日をday 0とし、以下に示した基準で、day 0～6までは3日おきに、day 8～22までは毎日、外見的症状につきスコアリングを行った。

スコアリング基準は、下記の通りである。

0 : 異常なし

1 : 立ち上がり反射の異常

2 : 後肢の不完全麻痺

3 : 後肢の完全麻痺

4 : 前肢の麻痺、瀕死

5 : 死亡

<統計解析>

解析は、統計解析ソフトSAS (Release 6.12, SAS Inc, Carry, NC, USA)を使用して行った。スコアの有意差検定は各日毎にWilcoxon rank sum testで検定した。

<結果>

図2にモルモットEAEモデルにおけるグループ1～4のクリニカルスコア (外見的症状) の経時的な変化を示した。

モルモットEAEモデルにおいて、CNS感作を行った後に溶媒のみを投与したグループ2 (Vehicle Control群) ではday 9～13までに全個体が発症し、感作後21日目には全個体が死亡した。グループ3 (IFN- β 投与群) におけるクリニカルスコアの変化はグループ2 (Vehicle Control群) とほぼ同様であり、明らか

な作用は認められなかった。一方、グループ4 (PEG-IFN- β 投与群) では全例が発症したが、グループ3 (Vehicle Control群) と比較するとday21, 22では有意なクリニカルスコアの抑制が認められた。

以上のように、PEGで化学修飾したIFN- β は、未修飾のIFN- β に比べて、多発性硬化症において有効であることが示唆された。

またインターフェロンは、多発性硬化症以外にも、肝炎を始めとしたウイルス性疾患、悪性腫瘍等の疾患に有用であることが知られており、PEG等で化学修飾したIFN- β は、ウイルス性疾患 (肝炎等)、悪性腫瘍等の疾患にも有用であると考えられる。

図面の簡単な説明

図1は、化学修飾インターフェロン- β と未修飾インターフェロン- β をマウスに投与した場合の、各インターフェロン- β の血中濃度の推移を表す。図1において、符号 (—◆—、—■—、—▲—、—○—、—□—) は各々下記の意味を表す。

- ◆—：未修飾rhIFN- β をマウスに静脈内注射したときの血中濃度推移
- ：5CHTO(2UU)-rhIFN- β をマウスに静脈内注射したときの血中濃度推移
- ▲—：5CHTM(2EA)-rhIFN- β をマウスに静脈内注射したときの血中濃度推移
- ：5CHTC(2AA)-rhIFN- β をマウスに静脈内注射したときの血中濃度推移
- ：10SCM-rhIFN- β をマウスに静脈内注射したときの血中濃度推移

図2は、モルモットEAEモデルにおける、グループ1 (Normal群)、グループ2 (Vehicle Control群)、グループ3 (IFN- β 投与群)、グループ4 (PEG-IFN- β 投与群) のクリニカルスコアの変化を表す。図2において、符号 (—○—、—●—、—□—、—■—) は各々下記の意味を表す。また値は平均値±標準偏差 (SE) を意味し、*は $p<0.05$ (Vehicle Control群対比) を表す。

- ：グループ1 (Normal群)
- ：グループ2 (Vehicle Control群)
- ：グループ3 (IFN- β 投与群)
- ：グループ4 (PEG-IFN- β 投与群)

発明を実施するための最良の形態

以下の実施例は本発明を具体的に説明するものであり、決して本発明の範囲を限定するものとして解釈すべきでない。実施例中の略号は特に断らない限り、それぞれ以下のことを意味する。なお、本明細書において使用したアミノ酸およびその保護基に関する略号は、生化学命名に関するIUPAC-IUB委員会

(IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature) の勧告 [ヨーロピアン・ジャーナル オブ バイオケミストリー (Eur. J. Biochem.)、138巻、9頁 (1984年)] に従った。

ELISA: 酵素免疫測定法 (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

SDS-PAGE: ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Sodium Dodecyl Sulfate-Poly Acrylamide Gel Electrophoresis)

PEG: ポリエチレングリコール (polyethylene glycol)

mPEG: モノメトキシポリエチレングリコール (monomethoxy polyethylene glycol)

IFN: インターフェロン (interferon)

hIFN: ヒトインターフェロン (human interferon)

rhIFN: 組換えヒトインターフェロン (recombinant human interferon)

G-CSF: 顆粒球コロニー刺激因子 (granulocyte-colony stimulating factor)

rhG-CSF: 組換えヒト顆粒球コロニー刺激因子 (recombinant human granulocyte-colony stimulating factor)

SOD: スーパーオキシドディスムターゼ (superoxide dismutase)

bSOD: ウシスーパーオキシドディスムターゼ (bovine superoxide dismutase)

hSOD: ヒトスーパーオキシドディスムターゼ (human superoxide dismutase)

DSC: N,N'-ジスクシンイミジルカーボネート (N,N'-disuccinimidyl carbonate)

TEA: トリエチルアミン (triethylamine)

DMF: N,N-ジメチルホルムアミド (N,N-dimethylformamide)

DMSO: ジメチルスルホキシド (dimethylsulfoxide)

NHS: N-ヒドロキシスクシンイミド (N-hydroxysuccinimide)

Ts: p-トルエンシルホニル (p-toluenesulfonyl)

TsCl: 塩化p-トルエンスルホニル (p-toluenesulfonylchloride)

DMAP: ジメチルアミノピリジン (dimethylaminopyridine)

PyBOP: ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロリン酸塩 (benzotriazol-1-yloxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate)

HOBt: N-ヒドロキシベンゾトリアゾール (N-hydroxybenzotriazole)

DCC: N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド (N,N'-dicyclohexylcarbodiimide)

LAH: 水素化アルミニウムリチウム (lithium aluminium hydride)

NM: N-メチルモルホリン (N-methylmorpholine)

TFA: トリフルオロ酢酸 (trifluoroacetic acid)

実施例 1 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール-シクロヘキサン誘導体の合成

略号: 5CHTO(2UU) (化合物番号 1)

cis,cis-1,3,5-シクロヘキサントリオール二水和物 (cis,cis-1,3,5-cyclohexanetriol dihydrate) (Fluka社製) 420.5mg (2.5mmol) およびDSC 3.2g (12.5mmol) をアルゴン気流中アセトニトリル20mlに溶解し、TEA 2.1ml (12.5mmol) を加え、室温で一昼夜攪拌した。溶媒を減圧下除去し、クロロホルムおよび0.1mol/L塩酸を加えて抽出した。クロロホルム層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧除去し、cis,cis-1,3,5-トリス (スクシンイミジルオキシカルボニルオキシ) シクロヘキサン [cis,cis-1,3,5-tris (succinimidylloxycarbonyloxy) cyclohexane] 357mg (0.64mmol) を得た (収率: 25.7%)。

次に、モノメトキシポリエチレングリコールプロピルアミン (monomethoxy polyethylene glycol propylamine) (mPEG-NH₂) [平均分子量5,000、日本油脂 (株) 製] 500mg (0.1mmol)、および上記で合成したシクロヘキサントリオールのトリスクシンイミジルカーボネート誘導体を塩化メチレン 12.5mlに溶解し、TEA 28μlを加え、室温で2時間攪拌した。その後、反応液をジエチルエーテルに滴下し、生成した白色沈殿を減圧乾燥し、残渣を472mg取得した (収率94.4%)。そのうち、372mgを逆相HPLCで精製した。カラムにはTSK gel ODS120-T (30mm×

250mm) (東ソー) を用い、0.1%TFA水溶液を移動相として、10ml/分の流量で流し、0～90%のアセトニトリルの直線濃度勾配で溶出させた。平均分子量10,000の目的の画分30mlを回収し、減圧下アセトニトリルを除去し、クロロホルムで抽出した。これをジエチルエーテルに滴下し、白色沈殿を濾取し減圧乾燥して目的物121.7mgを得た(回収率32.7%)。

<ゲル濾過HPLC分析>

移動相：150mmol/L塩化ナトリウム、20mmol/L酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.5)

流量：0.7ml/分

検出：RI

分離カラム：TSK gel G-2000SW_{XL} (7.8×300mm) (東ソー)

カラム温度：室温

保持時間：12.2分

<¹H-NMR分析 (CDCl₃; 300MHz) >

δ (ppm): 3.61(s, 8nH), 3.41(s, 6H), 4.69(br, 4H), 1.77(brm, 4H), 5.30(br, 2H), 0.8-3.4(m, 9H), 2.84(s, 4H)

実施例2 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール-シクロヘキサン誘導体の合成

略号：5CHTC(2AA) (化合物番号2)

84.0mg (0.388mmol) のcis,cis-1,3,5-シクロヘキサントリカルボン酸 (cis,cis-1,3,5-cyclohexane tricarboxylic acid) (Fluka社製) をDMF 50ml に溶解し、270.2mg (2.0mmol) のHOBtおよび1.04g (2.0mmol) のPyBOPを加えて0℃で30分間攪拌した。5g (1.0mmol) のモノメトキシポリエチレングリコールプロピルアミン[平均分子量5,000、日本油脂(株)製]、続いて219.7μl (1.9mmol) のNMMを加え、一昼夜攪拌した。1mol/Lの塩酸でpH1～2に調整し、クロロホルムで抽出した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、ジエチルエーテルに滴下した。白色沈殿を回収し、目的の化合物を含む粗生成物を3.78g (収率75.6%) 取得した。次に、300mlのDEAE-Sepharose F. F.カラム (Amersham-Pharmacia Biotech社) で精製した。水に溶解した粗生成物をカラムに添加し、さらに水600mlでカラムを洗浄した後、0.6～1.2mmol/Lの塩化ナトリウム水溶液で溶出し

た。その後、目的物画分をクロロホルムで抽出し、溶媒を減圧下除去して目的物を610.4mg (収率65.2%) 取得した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G-2000SW_{XL}カラムを用い実施例1と同様にして分析した。

保持時間：12.0分

<¹H-NMR分析 (CDCl₃, 300MHz) >

δ (ppm): 1.56(m, 3H), 2.1-2.5(m, 6H), 1.77(m, 4H), 2.1-2.3(br, 4H), 3.38(br, 4H), 3.64(s, 8nH), 3.36(s, 6H), 6.46(t, J=5.23Hz, 2H)

実施例3 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール-シクロヘキサン誘導体の合成

略号：5CHT0(2EA) (化合物番号3)

mPEG [平均分子量5,000、日本油脂(株)製] 50g (10mmol) を150mlのトルエンに溶解し、脱水還流した。そこへTEA 3.5ml (25mmol) を滴下し、1時間かけて、臭化チオニル/トルエン溶液 (臭化チオニル 1.55mlをトルエン 13.6mlに溶解) を滴下した。1時間還流した後、セライトを用いて濾過し、4時間室温で静置した。次に50°Cに加熱して活性炭を5g加えた。セライトを用いて活性炭を除去し、4°Cで1昼夜静置した。翌日上清を除去した後、残渣を60°Cのエタノール250mlへ溶解した。そこへ3gの活性炭を加え、セライトを用いて活性炭を除去した後4°Cで一昼夜静置した。翌日残渣を冷エタノールとジエチルエーテルで洗浄し、乾燥した後、臭素化したmPEG (mPEG-Br) を32.87g (収率65.74%) 取得した。

<¹H-NMR (CDCl₃, 300MHz) >

δ (ppm): 3.64(s, 4nH), 3.38(s, 3H), 3.48(t, J=6.3Hz, 2H), 3.81(t, J=6.3Hz, 2H)

次に、cis,cis-1,3,5-シクロヘキサントリオール二水和物 (cis,cis-1,3,5-cyclohexanetriol dihydrate) 1.322g (10mmol) を十分乾燥後、無水DMF 25mlに溶解し、アルゴン気流中、水素化ナトリウム 0.48g (11mmol) へ滴下し、30分間攪拌した。そこへDMF 25mlに溶解した上記のPEG-Br 10g (2mmol) を滴下し、室温で一昼夜攪拌した。その後、反応液をジエチルエーテルに滴下し、沈殿を

減圧下乾燥した。次に、乾燥した粉末を適量の水に溶解し、1mol/L塩酸でpHを3に調整し、クロロホルムで抽出し、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧除去した。残渣を少量の塩化メチレンに溶解し、ジエチルエーテルに滴下し、生成した沈殿を減圧乾燥してmPEGがシクロヘキサントリオール (cyclohexanetriol) に1分子結合した1本鎖型粗生成物を7.5g (収率75.0%) 取得した。

この粗生成物 5gにトルエン 50mlを加え、一昼夜脱水還流を行った。また、mPEG-Br 5.5g (1.1mmol) をトルエン 50mlに溶解し、160°Cで一昼夜脱水還流を行った。次に、上記粗生成物のトルエン溶液に水素化ナトリウム 144mg

(3.3mmol) を加え、30分間攪拌した後、mPEG-Brのトルエン溶液を滴下し、一昼夜脱水還流を行った後、濾過して不溶物を除去し、減圧下乾燥した。1mol/L塩酸を加えてpH1~2に調整し、クロロホルムで抽出した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、溶媒を減圧下除去し、残渣に塩化メチレン少量を加えて溶解した後、ジエチルエーテルに滴下した。生成した白色沈殿を減圧乾燥し、目的の化合物を含む粗生成物を7.73g (収率73.6%) 取得した。

粗生成物 1.5gを8%水酸化カリウム水溶液に溶解した後、アクリルアミド 150mg (2.11mmol) を添加し、室温で7時間攪拌した。さらにアクリルアミド 150mg (2.11mmol) を添加し、室温で4日間攪拌した。反応液を1mol/L塩酸でpH3に調整し、クロロホルムで抽出し、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧除去した。残渣を塩化メチレンに溶解後、ジエチルエーテルに滴下し、生成した沈殿を濾別し、減圧乾燥して粗目的物1.017g (67.8%) を得た。

60mlのDEAE-Sepharose F.F.カラム (Amersham-Pharmacia Biotech社) にカラムに添加し、0.4~1.4mmol/Lの塩化ナトリウム水溶液で溶出した。目的物を含む画分をクロロホルムで抽出した。クロロホルム層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後溶媒を減圧除去し、目的物を52mg取得した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G-2000SW_{XL}カラムを用い、実施例1と同様の条件で測定した。

保持時間: 12.7分

<¹H-NMR分析 (CDCl₃, 300MHz) >

δ (ppm): 2.59(t, J=16.0Hz, 2H), 0.8-3.4(m, 9H), 3.64(s, 8nH), 3.38(s, 6H)

実施例4 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール-シクロヘキサン誘導体の合成

略号: 5CHTM(2EA) (化合物番号4)

mPEG [平均分子量5,000、日本油脂(株)製] 400g (80mmol) をトルエン1L および塩化メチレン 500mlの混合溶媒に溶解した。TsCl 50g、次いでTEA 46.4ml を加え、室温で8時間攪拌した。次にTsCl 50gを添加し、16時間攪拌した。不溶物を濾別し、濾液を減圧濃縮した。得られた残渣を少量のクロロホルムに溶解して、ジエチルエーテル中に滴下した。生成した白色沈殿を回収し、減圧下で乾燥してトシルエステル化mPEG (mPEG-OTs) 344gを得た (収率86.0%)。

<¹H-NMR分析 (CDCl₃, 300MHz) >

δ (ppm): 2.45(s, 3H), 3.38(s, 3H), 3.70(s, 4nH), 4.16(t, J=5.0Hz, 2H), 7.34(d, J=6.8Hz, 2H), 7.80(d, J=8.1Hz, 2H)

mPEG-OTs 344gをDMF 1Lに溶解後、ヨウ化ナトリウム 54gを加え、80~90℃で1時間攪拌した。不溶物を濾別し、濾液をジエチルエーテル中に滴下した。生成した白色沈殿を濾過により回収し、減圧下で乾燥した。残渣を10%チオ硫酸ナトリウム水溶液1.5Lに溶解し、しばらく攪拌した後、クロロホルムで抽出した。溶媒を減圧除去し、ヨウ素化したmPEG (mPEG-I) 314gを得た (収率78.5%)。

<¹H-NMR分析 (CDCl₃, 300MHz) >

δ (ppm): 3.27(t, J=6.9Hz, 2H), 3.38(s, 3H), 3.67(s, 4nH)

40gのcis,cis-1,3,5-シクロヘキサントリカルボン酸 (Fluka社製) を1-プロパノール 1Lおよび濃硫酸 20mlに溶解し、室温で72時間攪拌した。その後、反応液に適当量の酢酸エチルを添加し、続いて飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で中和した。反応液を酢酸エチルで抽出し、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を減圧下除去し、cis,cis-1,3,5-シクロヘキサントリカルボン酸 n-プロピルエステル (cis,cis-1,3,5-cyclohexane tricarboxylic acid n-propyl ester) 72.4g (収率定量的) を得た。

<¹H-NMR分析 (CDCl₃, 300MHz) >

δ (ppm): 0.94(t, J=6.4Hz, 9H), 1.65(m, 6H), 4.05(t, J=6.6Hz, 6H), 1.56, 2.25, 2.40(各々m, 計9H)

1.19gのLAHを50mlのジエチルエーテルに溶解後、アルゴン雰囲気下、*cis,cis*-1,3,5-シクロヘキサントリカルボン酸*n*-プロピルエステル 3.2gのジエチルエーテル溶液 12.5mlを滴下した。さらに攪拌しながら41時間還流した。次いで、水 2.5mlを滴下し、そのまま15分間攪拌した。さらにエタノール 5mlを滴下し、室温で3時間攪拌した。反応液を濾過し、不溶物を沸騰エタノールで抽出した。このエタノール溶液を先程の濾液と合わせ、溶媒を減圧下除去した。得られた残渣を沸騰1,4-ジオキサンで抽出した後、硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を減圧下除去し、*cis,cis*-1,3,5-シクロヘキサントリメタノール (*cis,cis*-1,3,5-cyclohexane trimethanol) 1.50g (収率91.7%)を得た。

<質量分析 (FAB-MS) >

実測値: (M+H)⁺ 175

理論値: C₉H₁₈O₃=174

<¹H-NMR分析 (CDCl₃, 300MHz) >

δ (ppm): 3.21(t, J=5.9Hz, 6H), 4.35(t, J=5.1Hz, 3H), 0.43, 1.40, 1.75(各々m, 計9H)

cis,cis-1,3,5-シクロヘキサントリメタノール 2.5g(14mmol)を乾燥DMF 10mlに溶解し、0°C、アルゴン雰囲気下、水素化ナトリウム 2.28g (46.2mmol)へ滴下し、30分間攪拌した。そこへDMF 50mlに溶解した 40g (8mmol) のmPEG-Iを滴下し、室温で一昼夜攪拌した。その後、反応液をジエチルエーテルに滴下し、生成した沈殿を減圧下乾燥させた。次に乾燥させた粉末を適量の水に溶解し、1mol/L塩酸でpH3に調整し、クロロホルムで抽出し、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧除去した。残渣を少量の塩化メチレンに溶解後、ジエチルエーテルに滴下し、生成した沈殿を減圧乾燥して、mPEGが*cis,cis*-1,3,5-シクロヘキサントリメタノールに2分子結合した2本鎖型粗生成物 33.0g (83.0%)を得た。

この粗生成物 14.0gを8%水酸化カリウム水溶液に溶解した後、アクリルアミド 1.18g (16.7mmol)を添加し、室温で7時間攪拌した。さらにアクリルアミド 1.18g (16.7mmol)を添加し、室温で4日間攪拌した。反応液を1mol/L塩酸でpH3に調整し、クロロホルムで抽出し、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧除去した。残渣を少量の塩化メチレンに溶解後、ジエチルエーテルに

滴下し、生成した沈殿を濾取し、減圧乾燥して粗生成物 10.2g (73%) を得た。この粗生成物を1000mlのDEAE Sepharose F. F.カラム (Amersham-Pharmacia Biotech社) を用いて精製した。溶出は0.4~100mmol/Lの塩化ナトリウム水溶液で行った。目的物を含む画分をクロロホルムで抽出し、クロロホルム層から減圧下溶媒除去し、残渣をジエチルエーテルで沈殿させて目的物を500mg得た。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G2000SW_{XL}カラムを用い、実施例1と同様の条件で測定した。

保持時間: 12.7分

<¹H-NMR分析 (CDCl₃, 300MHz) >

δ (ppm): 3.38(s, 6H), 3.64(s, 8nH), 0.85, 1.26(各々m, 計9H)

実施例5 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール-シクロヘキサン誘導体の合成

略号: 5CHTM(2EU) (化合物番号5)

実施例4と同様にしてmPEGがシクロヘキサントリメタノールに2分子結合した2本鎖粗生成物を取得した。この粗生成物 2.7gを実施例1に示したTSK gel ODS120-Tカラムを用いた逆相HPLCで精製し、2本鎖PEG誘導体のみを含む画分を回収した。この画分から減圧下アセトニトリルを除去し、クロロホルムで抽出した。クロロホルム層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧乾燥し227mgの2本鎖PEG誘導体を得た(粗生成物からの収率8.4%)。2本鎖PEG誘導体 20mg (2μmol) を減圧乾燥し、1.2mg (10μmol) のDMAPおよび2.6mg (10μmol) のDSCを加え、塩化メチレンを1ml添加してアルゴン気流中室温で6時間攪拌した。反応液を濾過し、濾液をジエチルエーテル中に滴下した。生成した沈殿を回収し、減圧乾燥して、目的物を15mg得た(収率75%)。

<¹H-NMR (CDCl₃, 300MHz) >

δ (ppm): 3.61(s, 8nH), 3.41(s, 6H), 0.5-2.0(m, 9H), 2.84(s, 4H)

実施例6 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール-シクロヘキサン誘導体の合成

略号: 5QNA(2UA) (化合物番号6)

3mgの(1R, 3R, 4R, 5R) -(-)キナ酸 (Quinic acid) を乾燥DMF 250 μ lに溶解した後、17 μ lのトリエチルアミン、触媒量のCuClを添加した。さらに344mgのmPEG-NCO (平均分子量5,000、Shearwater Polymers, Inc.製) を添加し、室温で1時間攪拌した。10倍量のジエチルエーテルに滴下し、生成した沈殿を濾取し、減圧乾燥して粗目的物 306mg (88%) を得た。DEAE Sepharose F. F.カラム (Amersham-Pharmacia Biotech社) を用いて、実施例2と同様にして精製した。目的画分をクロロホルムで抽出し、溶媒を減圧除去して目的化合物 36mg (収率 10.5%) を得た。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G2000SW_{XL}カラムを用い、実施例1と同様の条件で測定した。

保持時間: 12.4分

<¹H-NMR分析 (CDCl₃, 300MHz) >

δ (ppm): 5.7-4.8(m, 3H), 3.33(s, 6H), 3.64(s, 8nH)

実施例7 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール-シクロヘキセン誘導体の合成

略号: 5SKA(2UA) (化合物番号7)

3.2mgのシキミ酸を乾燥DMF 250 μ lに溶解した後、15 μ lのトリエチルアミン、触媒量のCuClを添加した。さらに300mgのmPEG-NCO (平均分子量5,000、Shearwater Polymers, Inc.製) を添加し、室温で1時間攪拌した。10倍量のジエチルエーテルに滴下し、生成した沈殿を濾取し、減圧乾燥して粗目的物 270mg (89%) を得た。DEAE Sepharose F. F.カラム (Amersham-Pharmacia Biotech社) を用いて、実施例2と同様にして精製した。目的画分をクロロホルムで抽出し、溶媒を減圧除去して目的化合物 4mg (収率1.3%) を得た。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G2000SW_{XL}カラムを用い、実施例1と同様の条件で測定した。

保持時間: 12.4分

<¹H-NMR分析 (CDCl₃, 300MHz) >

δ (ppm): 6.6-5.1(m, 4H), 3.33(s, 6H), 3.64(s, 8nH)

実施例 8 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール-シクロヘキサン誘導体の合成

略号 : 5CHTM(2URa) (化合物番号 8)

50mgのcis, cis-1,3,5-シクロヘキサントリメタノールを脱水DMF 0.5mlに溶解した後、水素化ナトリウム 17mgを添加し、0°Cで15分間攪拌した。3-ブロモプロピオンアルデヒドジメチルアセタール 47 μ lを添加し、室温で16時間攪拌した。シリカゲルカラムで精製し、cis,cis-1,3,5-シクロヘキサントリメタノールの1位にプロピオンアルデヒドジメチルアセタール (propionaldehyde dimethylacetal) が結合した化合物を15mg得た (収率38%)。

<¹H-NMR分析 (DMSO-d₆, 300MHz) >

δ (ppm): 0.62(m, 9H), 1.54-1.88(m, 9H), 1.83(q, J=6.20Hz, 2H), 3.27(d, J=6.30Hz, 2H), 3.33(s, 6H), 3.39(d, J=6.30Hz, 4H), 3.46(t, J=6.20Hz, 2H), 4.51(t, J=5.70Hz, 1H)

<質量分析 (FAB-MS) >

実測値 : (M+H)⁺ 277

理論値 : C₁₄H₂₈O₅=276

得られた化合物 15mgを脱水DMF 1mlに溶解し、31 μ lのトリエチルアミン、触媒量のCuCl₂を添加した。598mgのmPEG-NCO (平均分子量5,000、Shearwater Polymers, Inc製) を添加し、室温で2時間攪拌した。溶液を10倍量のジエチルエーテルに滴下し、生成した白色沈殿を濾過により回収し、減圧下で乾燥した。得られた白色固体 578mgを実施例1と同様な逆相HPLCで精製し、383mgを得た。このうち100mgを70%酢酸水溶液に溶解し、40°Cで16時間攪拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で反応液を中和し、クロロホルムで抽出した。無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、減圧下反応液を濃縮した。10倍量のジエチルエーテルに滴下し、生成した白色沈殿を濾過により回収し、減圧下で乾燥した。逆相HPLCで再度精製し、目的物を39mg得た (収率41%)。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G2000SW_{XL}カラムを用い、実施例1と同様の条件で測定した。

保持時間 : 12.7分

<¹H-NMR分析 (CDCl₃, 300MHz) >

δ (ppm): 3.38(s, 6H), 9.79(t, J=1.56Hz, 1H), 3.64(s, 8nH)

実施例9 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール-シクロヘキサン誘導体の合成

略号: 5CHTM(2UM). (化合物番号9)

実施例4と同様にして合成したcis, cis-1, 3, 5-シクロヘキサントリメタノール 100mgおよびDSC 735mgを約10mlのアセトニトリルに溶解し、DMAP 210mgを加えて室温で5時間攪拌した。溶媒を減圧除去し、塩化メチレンおよび0.1mol/L塩酸を適量加え抽出した。有機層を減圧乾燥し、cis, cis-1, 3, 5-トリス(スクシンイミジルオキシカルボニルオキシメチル)シクロヘキサン [cis, cis-1, 3, 5-tris(succinimidyloxycarbonyloxymethyl)cyclohexane] を333mg得た(収率97%) [FAB-MS: 598(M+H)⁺]。

この化合物 30mg (0.05mmol) とmPEG-NH₂ [平均分子量5,000、日本油脂(株)製] 500mg (0.1mmol) を塩化メチレンに溶解し、TEA 20 μ lを加え、室温で2時間攪拌した。続いて、プロピレンジアミン(propylene diamine) 42 μ l(0.5mmol) (Aldrich製)を加え、室温でさらに2時間攪拌した。反応液を濾過し濾液をジエチルエーテルに滴下し、生成した沈殿を減圧乾燥して430mgの粉末を得た(収率86%)。この粉末 425mgを水 200mlに溶解し、20mlのSP Sepharose F.F. カラム (Amersham-Pharmacia Biotech社) で精製し、2本鎖PEGを含む目的画分よりクロロホルムで抽出し、得られた有機層をジエチルエーテルに滴下し、精製した沈殿を減圧乾燥した。得られた粉末 62.5mg (6.25 μ mol) を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 0.5mlに溶解し、氷冷下エトキシカルボニルマレイミド 2.1mgを加えて10時間攪拌した。続いて水 1.5mlを加え室温で15時間攪拌し、クロロホルムで3回抽出した。クロロホルム層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下溶媒を除去し25mgの粉末を得た(収率40%)。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G-2000SW_{XL} カラムを用い、実施例1と同様にして分析した。

保持時間: 12.4分

<¹H-NMR分析 (CDCl₃, 300MHz) >

δ (ppm): 0.63-0.75(m, 3H), 1.75-1.78(m, 12H), 3.1-3.3(m, 12H), 3.38(s, 6H),

3.64(s, 8nH), 5.20(br, 3H), 6.73(s, 2H)

実施例10 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール-シクロヘキサン誘導体の合成

略号: 5CHTM(2EA2) (化合物番号10)

実施例4と同様にして調製した100mgのcis, cis-1,3,5-シクロヘキサントリメタノールを脱水DMSO 23mlに溶解した後、tert-ブトキシカリウムのtert-ブタノール溶液 (1M) 958 mlを添加し、室温で1時間攪拌した。プロモ酢酸tert-ブチルエステルを添加し、90°Cで16時間攪拌した。室温まで放冷した後、シリカゲルカラムで精製し、1-0-tert-ブトキシカルボニルメチル-cys, cys-1,3,5-シクロヘキサントリメタノール (1-0-tert-butoxycarbonylmethyl-cys, cys-1,3,5-cyclohexane trimethanol) を22mg得た (収率13%)。

<¹H-NMR分析 (DMSO-d₆, 300MHz) >

δ (ppm): 0.60(m, 9H), 1.55-1.90(m, 9H), 1.48(s, 9H), 3.36(d, J=6.42Hz, 2H), 3.39 (d, J=6.15Hz, 4H), 3.95(s, 2H)

<質量分析 (FAB-MS) >

実測値: (M+H)⁺ 289

理論値: C₁₅H₂₈O₅=288

上記で取得した化合物 22mgをアルゴン雰囲気下脱水ピリジン 200μlに溶解し、そこへ脱水ピリジン 200μlに溶解した塩化トシル 23mgを添加した。0°Cで3時間攪拌した後、水を20μl添加し、さらにその後 100μl添加した。反応液を氷冷したクロロホルムで抽出し、氷冷した1mol/L塩酸、水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液の順で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、溶媒を除去し、シリカゲルカラムで精製することにより、1-0-tert-ブトキシカルボニルメチル-3-0,5-0-ジトシル-1,3,5-シクロヘキサントリメタノール (1-0-tert-butoxycarbonylmethyl-3-0,5-0-ditosyl-1,3,5-cyclohexane trimethanol) を22mg得た (収率48%)。

<¹H-NMR分析 (CDCl₃, 300MHz) >

δ (ppm): 1.26(m, 9H), 1.75(m, 9H), 1.47(s, 9H), 2.46(s, 6H), 3.29(d, J=6.30Hz, 2H), 3.80 (m, 4H), 3.89(s, 2H), 7.36(d, J=8.10Hz, 2H), 7.76(d,

$J=8.40\text{Hz}$, 2H)

<質量分析 (FAB-MS) >

実測値: $(M-\text{tert-Butyl}+2\text{H})^+$ 541

理論値: $\text{C}_{29}\text{H}_{40}\text{O}_9\text{S}_2=596$

1.4gのmPEG (平均分子量5,000、日本油脂 (株) 社製) を脱水トルエン2mlに溶解し、アルゴン雰囲気下、水素化ナトリウム 26mgへ滴下し、30分間攪拌した。そこへ脱水トルエン 500 μ lに溶解した76mgの1-O-tert-ブトキシカルボニルメチル-3-O,5-O-ジトシル-1,3,5-シクロヘキサントリメタノールを滴下し、室温で一昼夜攪拌した。その後、反応液をジエチルエーテルに滴下し、生成した白色沈殿を濾過により回収し、減圧下で乾燥した。得られた白色固体 1.2gを120mlのDEAE Sepharose F. F.カラムで実施例4と同様に精製し、目的物を154mgを得た (収率11%)。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G2000SW_{XL}カラムを用い、実施例1と同様の条件で測定した。

保持時間: 12.7分

< $^1\text{H-NMR}$ 分析 (CDCl_3 , 300MHz) >

δ (ppm): 3.38(s, 6H), 3.64(s, 8nH), 0.58(m, 9H), 1.72-1.93(m, 9H), 3.38(s, 6H)

実施例 1 1 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒトインターフェロン- β の製造

略号: 5CHTO(2UU)-rhIFN- β

塩化ナトリウムを含む20mmol/Lりん酸緩衝液 (pH7.5) で調製した1.3mg/mlの参考例6で得られるrhIFN- β 1.2mlに、実施例1で取得した化合物 15mg (蛋白質1モル当たり20モル) を加え、一昼夜4°Cで反応を行った。次に、反応液をSephacryl S300カラム 24ml (Amersham-Pharmacia Biotech社製) を用いてゲル濾過した。溶離液にはエチレングリコールおよび0.1mol/L塩化ナトリウムを含む20mmol/Lりん酸緩衝液を使用した。目的物を含む画分 14.5mlを回収し、水 14.5mlを加えて希釈し、CM-Sepharose F. F.カラム 1.5ml (Amersham-Pharmacia Biotech社製) で精製した。ゲル濾過で得られた画分を同カラムに通塔し、3ml

の同緩衝液で洗浄した後、1mol/L塩化ナトリウムを含む同緩衝液で溶出し、分画した。0.24mg/mlの目的物を含む画分 1.4mlを回収した（収率21.5%）。

<電気泳動>

2-メルカプトエタノール存在下でSDS-PAGEを行い、1~5分子結合体のバンドを確認した。

<電気泳動条件>

ゲル：PAGEL SPG 520L（アトー社製）

染色：FAST STAIN™

分子量マーカー：Low Molecular Weight Standard（バイオラッド社製）

<ゲル濾過HPLC分析>

移動相：150mmol/L塩化ナトリウム、20mmol/L酢酸ナトリウム緩衝液（pH4.5）

流量：0.5ml/分

検出：UV280nm

分離カラム：TSK gel G-4000SW_{XL}（7.8×300mm×2本連結）（東ソー社製）

保持時間：40.3分（1~4分子結合体）

実施例 1 2 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒトインターフェロン- β の製造

略号：5CHTC(2AA)-rhIFN- β

実施例2の化合物 100mg(0.01mmol)を、1.0mlの塩化メチレンに溶解し、NHS 5.7mg(0.05mmol)、DCC 10.3mg (0.05mmol)を加え、アルゴン気流中、0°Cで30分間攪拌した。その後3時間室温で攪拌し、反応液をジエチルエーテルに滴下した。白色沈殿を減圧乾燥して実施例2の化合物のNHSエステルを65.0mg得た（収率65.0%）。

塩化ナトリウムを含む20mmol/Lりん酸緩衝液（pH7.5）で調製した参考例6で得られるrhIFN- β 溶液 1.28ml（1.067mg/ml）へ、上記NHSエステルを17mg（蛋白質1モルに対して25モル）加え、4°Cで一昼夜反応した。次に、反応液をSephacryl S300カラム 24ml（Amersham-Pharmacia Biotec社製）を用いてゲル濾過した。溶離液にはエチレングリコールおよび0.1mol/L塩化ナトリウムを含む20mmol/Lりん酸緩衝液を使用した。目的物を含む画分 24mlを回収し、水 24ml

を加えて希釈し、CM-Sepharose F. F. カラム1.5ml (Amasham-Pharmacia Biotech社製) で精製した。ゲル濾過で得られた画分を同カラムに通塔し、3mlの同緩衝液で洗浄した後、1mol/L塩化ナトリウムを含む同緩衝液で溶出し、分画した。0.49mg/mlの目的物を含む画分 1.5mlを回収した (収率44.5%)。

<電気泳動>

実施例 1 1 と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1~4分子結合体のバンドを確認した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G-4000SW_{XL}カラムを2本用い、実施例 1 1 と同様の条件で分析した。

保持時間 : 43.9分 (1分子結合体)

41.0分 (2分子結合体)

実施例 1 3 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒトインターフェロン- β の製造

略号 : 5CHT0(2EA)-rhIFN- β

十分に乾燥した実施例 3 の化合物 20mgを塩化メチレンに溶解し、アルゴン気流中、NHS 1.15mgおよびDCC 2.06mgを加え、氷冷下30分間、続いて室温で2時間攪拌した。不溶物を濾過し、濾液をジエチルエーテルに滴下して沈殿させた。沈殿を減圧下乾燥してNHSエステルを14.5mg得た (収率72.5%)。

塩化ナトリウムを含む20mmol/Lりん酸緩衝液 (pH7.5) で調製した参考例 6 で得られるrhIFN- β 溶液 0.78ml (0.937mg/ml) に、上記NHSエステルを9.1mg (蛋白質1モルに対して25モル) 加え、4°Cで一昼夜反応した。次に、反応液をSephacryl S300カラム 24ml (Amersham-Pharmacia Biotech社製) を用いてゲル濾過した。溶離液にはエチレングリコールおよび0.1mol/L塩化ナトリウムを含む20mmol/Lりん酸緩衝液を使用した。目的物を含む画分 8.5mlを回収し、水 8.5mlを加えて希釈し、CM-Sepharose F. F. カラム 1.5ml (Amasham-Pharmacia Biotech社製) で精製した。ゲル濾過で得られた画分を同カラムに通塔し、3mlの同緩衝液で洗浄した後、1mol/L塩化ナトリウムを含む同緩衝液で溶出し、分画した。0.067mg/mlの目的物を含む画分 0.5mlを回収した (収率4.5%)。

<電気泳動>

実施例 1 1 と同様の方法で SDS-PAGE を行い、1~3 分子結合体のバンドを確認した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G-4000SW_{XL} カラム 2 本を用い、実施例 1 1 と同様の条件で分析した。
保持時間：35.9 分 (1~3 分子結合体)

実施例 1 4 5kDa 2 本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒトインターフェロン- β の製造

略号：5CHTM(2EA)-rhIFN- β

乾燥した実施例 4 の化合物 487mg (48.7 μ mol) を塩化メチレンに溶解し、アルゴン気流中、NHS 16.8mg (146.0 μ mol) および DCC 30.1mg (145.9 μ mol) を加え、氷冷下 30 分間、続いて室温で 2 時間攪拌した。不溶物を濾過し、濾液をジエチルエーテルに滴下して沈殿させた。沈殿を減圧下乾燥して NHS エステルを 260.0mg 得た (収率 53.4%)。

続いて、エチレングリコールおよび塩化ナトリウムを含む 20mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7.8) で調製した参考例 6 で得られる rhIFN- β 溶液 1.2ml (1.22mg/ml) に上記 NHS エステルを 14.6mg (蛋白質 1 モルに対して 20 モル) 加え、4°C で一昼夜反応した。次に、反応液をゲル濾過カラム Sephadex-G25 (NAP-10, Amersham-Pharmacia Biotech 社製) を用いてエチレングリコールを含む 20mmol/L リン酸緩衝液 (pH 6.0) に緩衝液交換した。ゲル濾過で得られた画分を CM-Sephacrose F. F. カラム 1.5ml (Amersham-Pharmacia Biotech 社) に通塔し、3ml の同緩衝液で洗浄した後、0.2~1.0mol/L 塩化ナトリウムを含む同緩衝液で溶出し、分画した。0.194mg/ml の目的物を含む画分 3.75ml を回収した (収率 49.7%)。

<電気泳動>

実施例 1 1 と同様に分析し、ポリエチレングリコールが 1~2 分子結合した修飾体を確認した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G-4000SW_{XL} カラム 2 本を用い、実施例 1 1 と同様にして分析した。
保持時間：42.9 分 (1 分子結合体)

40.2 分 (2 分子結合体)

実施例 15 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾天然型ヒトインターフェロン- β の製造

略号: 5CHTM(2EA)-天然型hIFN- β

天然型hIFN- β 10 μ g (STRATHMANN BIOTECH GMBH) を等張リン酸緩衝液 200 μ lに溶解し、実施例 14と同様にして得られた5CHTM(2EA)のNHSエステルを 1.5mg (蛋白質1モルに対して300モル) 加え、20°Cで一昼夜反応した。反応液をゲル濾過カラムSephadexG-25 (NAP-5、Amersham-Pharmacia Biotech社) でエチレングリコールを含む20mmol/Lりん酸緩衝液に緩衝液交換し、CM-Sepharose F. F.カラム 0.5ml (Amersham-Pharmacia Biotech社) で精製した。反応液 0.5ml をカラムに添加後、同緩衝液 5mlでカラムを洗浄した後、0.35mol/Lの塩化ナトリウムを含む緩衝液で溶出した。目的画分 1.0mlを濃縮し、0.021mg/mlの目的物を含む溶液 0.19ml得た (収率39.9%)。

実施例 16 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒトインターフェロン- α の製造

略号: 5CHTC(2AA)-rhIFN- α

等張りん酸緩衝液(pH7.5)で調製した1.0mg/mlのrhIFN- α [免疫生物研(IBM)] 0.1mlに、実施例 12と同様にして得られた5CHTC(2AA)のNHSエステル 1.5mg (蛋白質1モル当たり30モル) を加え、一昼夜4°Cで反応を行った。次に、反応液80 μ lをSephadex G-25カラム (NAP-5、Amersham-Pharmacia Biotech製) で20mmol/L酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.5) に緩衝液交換し、0.8mlを回収した。これを、SP-Sepharose F. F.カラム 1.0ml (Amersham-Pharmacia Biotech製) に通塔し、20mmol/L酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.5) 2.0mlで洗浄後、0.1~1.0mol/Lの塩化ナトリウムを含む同緩衝液で溶出した。80 μ g/mlの目的物を含む溶液 0.5mlを得た (収率40.0%)。

<電気泳動>

実施例 11と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1~4分子結合体のバンドを確認した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G-4000SW_{XL}カラムを用い、実施例 1 1 と同様の条件で分析した。

保持時間：43.1分 (1分子結合体)

40.5分 (2分子結合体)

実施例 1 7 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒトインターフェロン- α の製造

略号：5CHTM(2EA)-rhIFN- α

等張りん酸緩衝液 (pH7.5) で調製した0.95mg/mlのrhIFN- α (IBL) 0.1mlに、実施例 1 4 と同様にして得られた5CHTM(2EA)のNHSエステル 1.5mg (蛋白質1モル当たり30モル) を加え、一昼夜4°Cで反応を行った。次に、反応液 0.1mlをSephadex G-25カラム (NAP-5、Amersham-Pharmacia Biotech製) で20mmol/L酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.5) に緩衝液交換し、0.8mlを回収した。これを、SP-Sepharose F. F.カラム 1.0ml (Amersham-Pharmacia Biotech製) に通塔し、20mmol/L酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.5) 2.0mlで洗浄後、0.1~1.0mol/Lの塩化ナトリウムを含む同緩衝液で溶出した。50 μ g/mlの目的物を含む溶液 0.6mlを得た (収率31.6%)。

<電気泳動>

実施例 1 1 と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1~2分子結合体のバンドを確認した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G-4000SW_{XL}カラムを用い、実施例 1 1 と同様の条件で分析した。

保持時間：42.9分 (1分子結合体)

41.2分 (2分子結合体)

実施例 1 8 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒトインターフェロン- γ の製造

略号：5CHTC(2AA)-rhIFN- γ

エチレングリコールおよび塩化ナトリウムを含む20mmol/Lりん酸緩衝液 (pH7.8) で調製した参考例 7 で得られるrhIFN- γ (0.10mg/ml) 0.1mlに、実施例 1 2 と同様にして得られた5CHTC(2AA)のNHSエステル 1.0mg (蛋白質1モル

当たり200モル)を加え、4°Cで一昼夜反応した。

<電気泳動>

実施例11と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1~3分子結合体のバンドを確認した。

実施例19 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒトインターフェロン- γ の製造

略号: 5CHTM(2EA)-rhIFN- γ

エチレングリコールおよび塩化ナトリウムを含む20mmol/Lりん酸緩衝液(pH7.8)で調製した参考例7で得られるrhIFN- γ (0.8mg/ml) 0.8mlに、実施例14と同様にして得られた5CHTM(2EA)のNHSエステル 10.1mg (蛋白質1モル当たり30モル)を加え、4°Cで一昼夜反応した。

<電気泳動>

実施例11と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1~3分子結合体のバンドを確認した。

実施例20 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子誘導体の製造

略号: 5CHTO(2UU)-rhG-CSF誘導体

50mmol/Lりん酸緩衝液(pH7.5)で3.2mg/mlに調製した参考例5で得られるrhG-CSF誘導体 100 μ lに実施例1の化合物 1.7mg (蛋白質1モルに対して10モル)を添加し、4°Cで一昼夜反応させた。反応液を20mmol/L酢酸緩衝液(pH4.5)で10倍に希釈し、そのうち900 μ lを同緩衝液で平衡化したSephadex G-25カラム(NAP-10, Amersham-Pharmacia Biotech製)に通塔し、1.3mlを回収した。これをSP-Sepharose F. F.カラム 0.7ml (Amersham-Pharmacia Biotech製)に通塔し、20mmol/L酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.5) 4.9mlで洗浄後、75~500mmol/Lの塩化ナトリウムを含む同緩衝液で溶出した。目的物を含む画分を統合し、濃縮した。402 μ g/mlの目的物を含む溶液 360 μ lを得た(収率50.3%)。

<電気泳動>

実施例11と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1~4分子結合体のバンドを確認

した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G4000SW_{XL}カラム2本を用い、実施例11と同様にして分析した。

保持時間：42.8分（1分子結合体）

41.3分（2分子結合体）

実施例21 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子誘導体の製造

略号：5CHTC(2AA)-rhG-CSF誘導体

50mmol/Lりん酸緩衝液（pH7.5）で3.9mg/mlに調製した参考例5で得られるrhG-CSF誘導体 100 μ lに5.1mg（蛋白質1モル当たり25モル）の実施例12と同様にして得られた5CHTC(2AA)のNHSエステルを添加し、4℃で一昼夜反応させた。反応液を10倍に希釈し、そのうち900 μ lをSephadex G-25カラム（NAP-10、Amersham-Pharmacia Biotech製）で20mmol/L酢酸緩衝液（pH4.5）に緩衝液交換し、1.3mlを回収した。これをSP-Sepharose F. F.カラム 0.7ml（Amersham-Pharmacia Biotech製）に通塔し、20mmol/L酢酸ナトリウム緩衝液（pH4.5）4.9mlで洗浄後、100mmol/Lの塩化ナトリウムを含む同緩衝液で溶出した。目的画分を濃縮し、179 μ g/mlの目的物を含む溶液500 μ lを得た（収率25.8%）。

<電気泳動>

実施例11と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1～3分子結合体のバンドを確認した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G4000SW_{XL}カラム2本を用い、実施例11と同様にして分析した。

保持時間：42.8分（1分子結合体）

40.3分（2分子結合体）

実施例22 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子誘導体の製造

略号：5CHT0(2EA)-rhG-CSF誘導体

50mmol/Lりん酸緩衝液（pH7.5）で3.8mg/mlに調製した参考例5で得られる

rhG-CSF誘導体 100 μ lに6.0mg (蛋白質1モル当たり25モル) の実施例13と同様にして得られた5CHT0(2EA)のNHSエステルを添加し、4°Cで一昼夜反応させた。反応液を10倍に希釈し、そのうち900 μ lをSephadex G-25カラム (NAP-10、Amersham-Pharmacia Biotech製) で20mmol/L酢酸緩衝液 (pH4.5) に緩衝液交換し、1.3mlを回収した。これをSP-Sepharose F. F.カラム 0.7ml (Amersham-Pharmacia Biotech製) に通塔し、20mmol/L酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.5) 4.9mlで洗浄後、100~500mmol/Lの塩化ナトリウムを含む同緩衝液で溶出した。目的画分を統合後濃縮し、335 μ g/mlの目的物を含む溶液 450 μ lを得た (収率44.2%)。

<電気泳動>

実施例11と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1~3分子結合体のバンドを確認した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G4000SW_{XL}カラムを用い、実施例11と同様にして分析した。

保持時間: 42.6分 (1分子結合体)

39.5分 (2分子結合体)

実施例23 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子誘導体の製造

略号: 5CHTM(2EA)-rhG-CSF誘導体

十分に乾燥した実施例4の化合物 487mg (48.7 μ mol) を塩化メチレンに溶解し、アルゴン気流中、NHS 16.8mg (146.0 μ mol)、DCC 30.1mg (145.9 μ mol) を加え、氷冷下30分間、続いて室温で2時間攪拌した。不溶物を濾過し、濾液をジエチルエーテルに滴下した。沈殿を回収し、減圧乾燥して化合物4のNHSエステルを260.0mg得た (収率53.4%)。

等張リン酸緩衝液 (pH7.4) で調製した参考例5で得られるrhG-CSF誘導体 1.25ml (4.0mg/ml) に上記NHSエステルを26.6mg (蛋白質1モル当たり25モル) 加え、4°Cで一昼夜反応した。反応液 1.0mlをSephadex G-25カラム (NAP-10、Amersham-Pharmacia Biotech社) で20mmol/L酢酸緩衝液 (pH4.5) に緩衝液交換し、1.5mlを回収した。これをSP-Sepharose F. F.カラム5.0ml (Amersham-Pharmacia Biotech社) で精製した。10mlの緩衝液で未吸着成分を洗浄後、0.1

～0.5mol/Lの塩化ナトリウムを含む緩衝液で溶出した。目的物を含む画分 10ml を3倍に希釈し、再度5.0mlのSP-Sepharose F. F.カラムで同様に精製した。目的物を含む画分 15mlを回収後、濃縮し、1.86mg/mlの目的物を含む溶液 0.7ml を取得した（収率32.5%）。

<電気泳動>

実施例 1 1 と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1～3分子結合体のバンドを確認した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G4000SW_{XL}カラム2本を用い、実施例 1 1 と同様に分析した。

保持時間：48.7分（1分子結合体）

46.9分（2分子結合体）

実施例 2 4 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子誘導体の製造

略号：5CHTM(2EU)-rhG-CSF誘導体

50mmol/Lリン酸緩衝液（pH7.3）で3.9mg/mlに調製した参考例 5 で得られる rhG-CSF誘導体 50 μ lに、実施例 5 の化合物を1.0mg（蛋白質1モル当たり10モル）を添加し、4℃で一昼夜反応させた。

<電気泳動>

実施例 1 1 と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1～2分子結合体のバンドを確認した。

実施例 2 5 5kDa 2本鎖型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子の製造

略号：5CHTM(2EA)-rhG-CSF

等張りん酸緩衝液（pH7.4）で3.9mg/mlに調製したrhG-CSF溶液 0.9mlに、実施例 1 4 と同様に得られた5CHTM(2EA)のNHS エステル28.0mg（蛋白質1モル当たり15当量）を添加し、4℃で一昼夜反応させた。反応液 0.8mlをSephadex G-25 カラム（NAP-10、Amersham-Pharmacia Biotech社）で20mmol/L酢酸緩衝液（pH4.5）に緩衝液交換し、1.5mlを回収した。これをSP-Sepharose F. F.カラム 5.0ml

(Amersham-Pharmacia Biotech社) に添加した。酢酸ナトリウム緩衝液 10mlを流した後、0.05~0.3mol/Lの塩化ナトリウムを含む同緩衝液で溶出、分画した。目的画分10mlを回収後、濃縮し、1.3mg/mlの目的物を含む溶液 1.0mlを得た(収率33.0%)。

<電気泳動>

実施例 1 1 と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1~3分子結合体のバンドを確認した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G4000SW_{XL} カラム2本を用い、実施例 1 1 と同様にして分析した。
保持時間 : 42.8分 (1分子結合体)
40.1分 (2分子結合体)

実施例 2 6 5kDa 2本鎖型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子の製造
略号 : 5CHTC(2AA)-rhG-CSF

等張リン酸緩衝液 (pH7.4) で3.9mg/mlに調製した参考例 5 で得られるrhG-CSF 溶液 0.2mlに、実施例 1 2 と同様にして得られた5CHTC(2AA)のNHSエステル 10.0mg (蛋白質1モル当たり25当量) を添加し、4℃で一昼夜反応させた。

反応液 0.2mlをSephadex G-25カラム (NAP-5、Amersham-Pharmacia Biotech社) で20mmol/L酢酸緩衝液 (pH4.5) に緩衝液交換し、1.0mlを回収した。これをSP-Sepharose F. F.カラム 1.0ml (Amersham-Pharmacia Biotech社) に添加した。酢酸ナトリウム緩衝液 2.5mlを流した後、0.05~0.3mol/Lの塩化ナトリウムを含む同緩衝液で溶出、分画した。目的画分 3.5mlを回収後、濃縮し、0.7mg/mlの目的物を含む溶液 0.3mlを得た (収率26.8%)。

<電気泳動>

実施例 1 1 と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1~3分子結合体のバンドを確認した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G4000SW_{XL} カラム2本を用い、実施例 1 1 と同様にして分析した。
保持時間 : 42.9分 (1分子結合体)

40.4分 (2分子結合体)

実施例 27 5kDa 2本鎖型ポリエチレングリコール修飾ウシCu,Zn型スーパーオキサイドディスムターゼの製造

略号: 5CHTC(2AA)-bSOD

十分乾燥した実施例 2 の化合物 30mg (3 μ mol) を塩化メチレン 1ml に溶解し、NHS 1.7mg (0.015mmol) およびDCC 3.1mg (0.015mmol) を加え、0°Cで30分間攪拌した。その後3時間室温で攪拌し、反応液をジエチルエーテルに滴下した。白色沈殿を減圧乾燥して実施例 2 の化合物のNHSエステルを21mg得た (収率70%)。

ウシCu,Zn型SOD溶液 (2mg/ml、pH9ほう酸緩衝液、和光純薬製) 50 μ lに使用直前に調製した上記NHSエステルの水溶液 (156mg/ml蒸留水) 10 μ l (蛋白質1モルあたり50モル) を加え、4°Cで一昼夜静置して反応させた。

<電気泳動>

実施例 11と同様の条件でSDS-PAGEを行い、1~2分子結合体のバンドを確認した。

実施例 28 5kDa 2本鎖型ポリエチレングリコール修飾ウシCu,Zn型スーパーオキサイドディスムターゼの製造

略号: 5CHTO(2EA)-bSOD

実施例 3 の化合物 20mgを実施例 13と同様の条件で活性化し、NHSエステルを13mg得た (収率65%)。

次に、ウシCu,Zn型SOD溶液 (2mg/ml、pH9ほう酸緩衝液、和光純薬製) 50 μ lに使用直前に調製した上記NHSエステルの水溶液 (156mg/ml蒸留水) 10 μ l (蛋白質1モルあたり50モル) を加え、4°Cで一昼夜静置して反応させた。

<電気泳動>

実施例 11と同様の条件でSDS-PAGEを行い、1~2分子結合体のバンドを確認した。

実施例 29 5kDa 2本鎖型ポリエチレングリコール修飾ウシCu,Zn型スーパーオキサイドディスムターゼの製造

略号：5CHTO(2UU)-bSOD

ウシCu,Zn型SOD溶液 (2mg/ml、pH9ほう酸緩衝液、和光純薬製) 50 μ lに実施例1で得た化合物の水溶液 (156mg/ml蒸留水) 10 μ l (蛋白質1モルあたり50モル) を加え、4°Cで一昼夜静置して反応させた。

<電気泳動>

実施例11と同様の条件でSDS-PAGEを行い、1~3分子結合体のバンドを確認した。

実施例30 5kDa 2本鎖型ポリエチレングリコール修飾ウシCu,Zn型スーパーオキサイドディスムターゼの製造

略号：5CHTM(2EA)-bSOD

実施例4の化合物 487mg (48.7 μ mol) を実施例14と同様の条件で活性化し、NHSエステルを260mg得た。(収率53.4%)

ウシCu,Zn型SOD溶液 (2mg/ml、pH9ほう酸緩衝液、和光純薬製) 50 μ lに使用直前に調製した上記NHSエステルの水溶液 (156mg/ml蒸留水) 10 μ l (蛋白質1モルあたり50モル) を加え、4°Cで一昼夜静置して反応させた。

<電気泳動>

実施例11と同様の条件でSDS-PAGEを行い、1~3分子結合体のバンドを確認した。

実施例31 5kDa 2本鎖型ポリエチレングリコール修飾ウシCu,Zn型スーパーオキサイドディスムターゼの精製

略号：5CHTM(2EA)-bSOD (精製品)

実施例4の化合物 360mg (36.0 μ mol) を実施例14と同様の条件で活性化し、NHSエステルを181.9mg得た (収率50.5%)。

ウシCu,Zn型SOD溶液 (2mg/ml、pH9ほう酸緩衝液、和光純薬製) 2.2mlに上記NHSエステル 33.9mg (蛋白質1モルあたり25モル) を加え、4°Cで一昼夜反応させた。次に、この反応液を4.3mlのSP-Sepharose F. F.カラム (Amersham-Pharmacia Biotech社) で精製した。カラムに反応液をカラムに添加し、20mmol/L酢酸緩衝液 (pH3.5) でカラムを洗浄した後、0.1~1.0mol/Lの塩化ナトリウム

を含む同緩衝液で溶出した。その後、未修飾SODの含まれない目的画分を濃縮し、3.73mg/mlの溶液を200 μ l得た（収率17.2%）。さらにCuSO₄、ZnSO₄水溶液を各々10mmol/Lになるように加えて活性を回復した。

<電気泳動>

実施例 1 1と同様の条件でSDS-PAGEを行い、1~3分子結合体のバンドを確認した。

実施例 3 2 5kDa 2本鎖型ポリエチレングリコール修飾ヒトCu, Zn型スーパーオキサイドディスムターゼの製造

略号：5CHTM(2EA)-hSOD

実施例 4の化合物 487mg (48.7 μ mol) を実施例 1 4と同様の条件で活性化し、NHSエステルを260mg得た（収率53.4%）。

ヒトCu, Zn型SOD溶液（1.9mg/ml、pH9ほう酸緩衝液、CELLULAR PRODUCTS, INC. 製）50 μ lに使用直前に調製した上記NHSエステルの水溶液（156mg/ml蒸留水）10 μ l（蛋白質1モルあたり50モル）を加え、4°Cで一昼夜静置して反応させた。

<電気泳動>

実施例 1 1と同様の条件でSDS-PAGEを行い、1~3分子結合体のバンドを確認した。

実施例 3 3 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒトインターフェロン- β の製造

略号：5CHTM(2EA)-¹⁷Ser rhIFN- β

エチレングリコールおよび塩化ナトリウムを含む20mmol/Lりん酸緩衝液（pH7.6）で調製した¹⁷Ser rhIFN- β （Chiron社製）の溶液 0.1ml（1.0mg/ml）へ、実施例 1 4と同様にして得られた5CHTM(2EA)のNHSエステル 1.3mg（蛋白質1モル当たり25モル）を加え、4°Cで一昼夜反応した。次に、反応液をゲル濾過カラムSephadex G-25（NAP-5、Amersham-Pharmacia Biotech社）を用いてエチレングリコールを含む20mmol/Lりん酸緩衝液（pH6.0）に緩衝液交換した。ゲル濾過で得られた画分をCM Sepharose F. F.カラム 0.25ml（Amersham-Pharmacia Biotech社）に通塔し、4.0mlの同緩衝液で洗浄した後、0.2~0.35mol/L塩化ナ

トリウムを含む同緩衝液で溶出した。39 μ g/mlの目的物を含む画分 0.75mlを回収した（収率39％）。

<電気泳動>

実施例 1 1と同様に分析し、ポリエチレングリコールが1~3分子結合した修飾体を確認した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G-4000SW_{XL}カラム2本を用い、実施例 1 1と同様にして分析した。
保持時間：41.3分（1~3分子結合体）

実施例 3 4 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾ヒトCu、Zn型スーパーオキシドディスムターゼの製造

略号：5CHTM(2UM)-hSOD

実施例 9 の化合物 [5CHTM(2UM)] 3.13mg（蛋白質1モル当たり10モル）をヒトCu,Zn型SOD溶液 [2.63mg/ml、りん酸緩衝液（pH7.5）、CELLULAR PRODUCTS, INC. 製] 0.6mlに加えて4℃で一昼夜静置して反応した。次に、20mlのSephacryl S-300ゲル濾過カラム（Amersham-Pharmacia Biotech社）で150mmol/L塩化ナトリウムを含む酢酸緩衝液（pH4.5）で精製した。未反応のSODを含まない修飾体の画分を回収し、0.5mlまで濃縮した。この溶液をSephadex G-25カラム（NAP-5、Amersham-Pharmacia Biotech社）で20mmol/L酢酸緩衝液（pH3.5）に緩衝液交換し、0.8mlを回収した。これをSP-Sepharose F.F.カラム0.7ml（Amersham-Pharmacia Biotech社）に添加した。同緩衝液 3.5mlを流した後、0.5~1.0mol/Lの塩化ナトリウムを含む同緩衝液で溶出した。目的画分を回収後、濃縮した。さらに、CuSO₄、ZnSO₄水溶液を含む溶液各々10mmol/Lになるように加え、SODの活性を回復した。0.25mg/mlの目的物を含む溶液を180 μ l取得した（収率4.5％）。

<電気泳動>

実施例 1 1と同様の条件でSDS-PAGEを行い、1分子結合体のバンドを確認した。

実施例 3 5 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒト顆粒球コロニー形成刺激因子誘導体の調製

略号：5CHTM(2URa)-rhG-CSF誘導体

50mmol/Lりん酸緩衝液 (pH 7.5) で3.9mg/mlに調製した参考例5で得られる rhG-CSF誘導体 50 μ lに実施例8で得られた5.2mg (蛋白質1モル当たり50モル) のPEG誘導体 [5CHTM(2URa)] を添加し、120mmol/Lの水素化ホウ素ナトリウム 10 μ lを加え、室温で18時間反応させた。

<電気泳動>

実施例11と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1分子結合体のバンドを確認した。

実施例36 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒト顆粒球コロニー形成刺激因子誘導体の製造

略号: 5CHTM(2EA2)-rhG-CSF誘導体

実施例10の化合物 100mg (0.01mmol) を1.0mlの塩化メチレンに溶解し、NHS 3.5mg (0.03mmol)、DCC 6.2mg (0.03mmol) を加え、アルゴン気流中、0°Cで90分間、その後室温で2時間攪拌し、反応液をジエチルエーテルに滴下した。白色沈殿を減圧乾燥してNHSエステルを56.5mg得た (収率56.5%)。

50mmol/Lりん酸緩衝液 (pH7.5) で3.9mg/mlに調製した参考例5で得られる rhG-CSF誘導体 210 μ lに4.2mg (蛋白質1モル当たり10モル) の上記NHSエステルを添加し、4°Cで一昼夜反応させた。反応液をSephadex G-25カラム (NAP-5、Amersham-Pharmacia Biotech社) で20mmol/L酢酸緩衝液 (pH4.5) に緩衝液交換し、続いてSP Sepharose F.F.カラム 0.7ml (Amersham-Pharmacia Biotech社) で精製した。75mmol/L~1mol/Lの塩化ナトリウムを含む同緩衝液で溶出し、0.31mg/mlの目的物を含む画分を965 μ l得た (収率39.6%)。

<電気泳動>

実施例11と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1~3分子結合体のバンドを確認した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G-4000SWXLカラムを用い、実施例11と同様にして分析した。

保持時間: 42.2分 (1分子結合体)

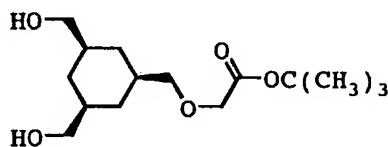
40.6分 (2分子結合体)

実施例37 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール-シクロヘキサン誘導

体の合成

略号：5CHTM(2UA) (化合物番号 3.7)

100 mgのcis,cis-1,3,5-シクロヘキサントリメタノールを脱水DMSO 23 mlに溶解した後、tert-ブトキシカリウムのtert-ブタノール溶液(1 mol/L) 958 μ lを添加し、室温で1時間攪拌した。プロモ酢酸 tert-ブチルエステルを添加し、90°Cで16時間攪拌した。室温まで放冷した後、シリカゲルカラムで精製し、下記に示す化合物を 22mg得た (収率13%)。

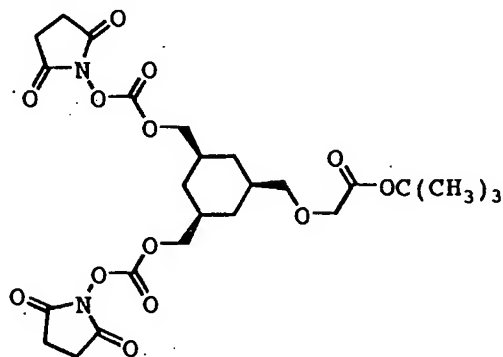
<¹H-NMR 分析 (DMSO-d₆, 300MHz)>

δ (ppm): 0.5-1.9 (m, 9H), 1.48 (s, 9H), 3.36 (d, J=6.4Hz, 2H), 3.39 (d, J=6.4Hz, 4H), 3.95 (s, 2H)

<質量分析 (FAB-MS)>

実測値: (M+H)⁺ 289理論値: C₁₅H₂₈O₅ = 288

867 mg の上記化合物をアルゴン雰囲気下、脱水アセトニトリル 5ml に溶解し、そこへ DSC 1.95 g、続いて DMAP 526 mg を添加し、室温で終夜攪拌した。反応液を氷冷し、同じく氷冷した 0.1mol/L 塩酸を添加し、塩化メチレンで抽出した。無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、溶媒を減圧下除去し、下記に示す化合物を 1.84 g 得た (定量的)。



<¹H-NMR分析 (CDCl₃, 300MHz)>

δ (ppm): 0.7-1.9 (m, 9H), 1.47 (s, 9H), 2.82 (s, 8H), 3.37 (d, J=6.0Hz, 2H), 3.93 (s, 2H), 4.17 (d, J=5.9Hz, 4H)

<質量分析 (FAB-MS)>

実測値: (M-tert-butyl+2H)⁺ 515

理論値: C₂₅H₃₄N₂O₁₃ = 570

1.84 gの上記化合物を36mlの塩化メチレンに溶解した。そこへ33gのmPEG-NH₂ (日本油脂 (株) 製) を含む塩化メチレン溶液 36mlを滴下し、その後、TEA 935 μlを添加し、室温で4時間攪拌した。その後、反応液をジエチルエーテルに滴下し、生成した白色沈殿を濾過により回収し、減圧下で乾燥した。得られた白色固体を173mlのトリフルオロ酢酸/塩化メチレン/水 (500/500/1)混合溶液に溶解し、室温で4時間攪拌した。反応液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で中和し、クロロホルムで抽出した。無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、溶媒を減圧下除去し、白色固体 33gを得た。これを1000mlのDEAE-Sepharose F.F.カラム (Amersham-Pharmacia Biotech社) で実施例3と同様に精製し、目的物 13 gを得た。

<¹H-NMR分析 (CDCl₃, 300MHz)>

δ (ppm): 0.6-2.0 (m, 9H), 1.75 (m, 6H), 3.28 (m, 4H), 3.38 (s, 6H), 3.62 (s, 8nH), 4.02 (s, 2H), 5.28 (t, J=4.8Hz, 2H)

<ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G-2000SW_{XL}カラムを用い、実施例1と同様の条件で測定した。

保持時間: 11.4分

実施例3 8 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒトインターフェロン-βの製造

略号: 5CHTM(2UA)-rhIFN-β

実施例3 7の化合物 1g(0.1mmol)を、10.0mlの塩化メチレンに溶解し、NHS 34.5mg(0.3mmol)、DCC 62mg(0.3mmol)を加え、0°Cで1時間攪拌した後、2時間室

温で攪拌し、反応液をジエチルエーテルに滴下した。白色沈殿を減圧乾燥して実施例37の化合物のNHSエステルを650mg得た(収率65%)。

続いて、エチレングリコールおよび塩化ナトリウムを含む20mmol/Lリン酸緩衝液(pH7.8)で調製した参考例6で得られるrhIFN- β 溶液 10ml(1.18mg/ml)へ、上記NHSエステルを147.3mg(蛋白質1モルに対して25モル)加え、4℃で一昼夜反応した。反応液 10mlをSephadex G-25カラム (Amersham-Pharmacia Biotech社)でエチレングリコールを含む20mmol/Lりん酸緩衝液 (pH6)に緩衝液交換し、12mlを回収した。これをCM-Sepharose F.F.カラム10ml (Amersham-Pharmacia Biotech社)で精製し、2.3mg/mlの目的物を含む溶液 1.1mlを得た(収率21.4%)。

<電気泳動>

実施例11と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1~4分子結合体のバンドを確認した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G-4000SW_{XL}カラムを用い、実施例11と同様の条件で分析した。

保持時間: 43.0分 (1分子結合体)

40.2分 (2分子結合体)

実施例39 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾抗GD3キメラ抗体の製造

略号: 5CHTM(2EA2)-KM-871

20mmol/Lりん酸緩衝液(pH7.5)で2.6mg/mlに調製したKM-871溶液 0.5ml (特開平5-304989に従って調製)に、実施例36で得られた化合物5CHTM(2EA2)のNHSエステル 1.0mg(蛋白質1モルに対して10モル)を加え、4℃で一昼夜反応した。反応液 0.5mlをCM-Sepharose F.F.カラム 1.2ml (Amersham-Pharmacia Biotech社)で精製し、0.59mg/mlの目的物を含む溶液 0.38mlを得た(収率17.1%)。

<電気泳動>

実施例11と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1~2分子結合体のバンドを確認した。

参考例1 10kDa 1本鎖型ポリエチレングリコール誘導体の合成

略号：10SCM

構造： $\text{CH}_3(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OCH}_2\text{COOH}$

S. ZalipskyとG. Baranyの方法 [ジャーナル オブ バイオアクティブ アンド コンパチブル ポリマーズ (Journal of Bioactive and compatible polymers) 5巻、227頁 (1990年)] に準じて以下の方法で製造した。

乾燥したモノメトキシポリエチレングリコール [平均分子量10,000、日本油脂 (株) 社製SUNBRIGHT VFM-3010M] 10gを乾燥トルエン50mlに溶解し、tert-ブトキシカリウム 1.12gを加え蒸留し、初めの留分 30mlを除去した。アルゴン気流中、50℃に冷却後、 α -ブromo酢酸エチル 1.1mlを加え、一昼夜攪拌を続けた。反応混合物を500mlのジエチルエーテルに滴下し、生成した沈殿を濾過により回収し、減圧下乾燥した。続いて、得られた乾燥粉末 9.2gを1mol/L水酸化ナトリウム水溶液 150mlに溶解し、室温で1時間攪拌した。1mol/L塩酸 160mlを加え、クロロホルム 500mlで抽出した。クロロホルム層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、10mlまで減圧濃縮した後、300mlのジエチルエーテル中に滴下し、生成した沈殿を減圧乾燥して白色粉末 7.5gを得た (収率75%)。

< ^1H -NMR分析 (CDCl_3 , 300MHz) >

δ (ppm): 3.64(s, 4nH), 3.38(s, 3H), 4.15(s, 2H)

参考例2 10kDa 1本鎖型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒトインターフェロン- β の製造

略号：10SCM-rhIFN- β

十分に乾燥した参考例1の化合物 1.0g (0.1mmol) を塩化メチレンに溶解し、アルゴン気流中、NHS 21.8mg (0.19mmol) およびDCC 39.0mg (0.19mmol) を加え氷冷下、30分間、続いて室温で2時間攪拌した。不溶物を濾過し、濾液をジエチルエーテルに滴下して沈殿させた。沈殿を減圧下乾燥してNHSエステルを 506.8mg得た (収率50.7%)。

続いて、エチレングリコールおよび塩化ナトリウムを含む20mmol/Lりん酸緩衝液 (pH7.8) で調製した参考例6で得られるrhIFN- β 溶液 3.0ml (0.81mg/ml) に上記NHSエステルを16.2mg加え、4℃で一昼夜反応した。次に、反応液をゲル濾過カラムSephadex-G25 (NAP-10、Amersham-Pharmacia Biotec社製) を用いて

脱塩した。ゲル濾過で得られた画分 4.5mlをCM Sepharose F. F.カラム 2.0ml (Amasham-Pharmacia Biotech社)に通塔し、0.05~1.0mol/L塩化ナトリウムを含む同緩衝液で溶出した。0.22mg/mlの目的物を含む画分 4.0mlを回収した(収率36.2%)。

<電気泳動>

実施例 1 1と同様に分析し、ポリエチレングリコールが1~3分子結合した修飾体を確認した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G-4000SW_{HL}カラム2本を用い、実施例 1 1と同様にして分析した。

保持時間: 44.2分 (1分子結合体)

41.0分 (2分子結合体)

参考例 3 10kDa 1本鎖型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子誘導体の製造

略号: 10SCM-rhG-CSF誘導体

50mmol/Lりん酸緩衝液 (pH7.5) で4.0mg/mlに調製した参考例 5で得られる rhG-CSF誘導体 2.5mlに21.3mg (蛋白質1モル当たり4モル) の参考例 2と同様にして得られた10SCMのNHSエステルを添加し、4°Cで一昼夜反応させた。反応液を20mmol/L酢酸緩衝液 (pH4.5) で平衡化したSephadex G-25カラム (NAP-10、Amersham-Pharmacia Biotech製)に通塔し、4.0mlを回収した。これをSP-Sepharose F. F.カラム 10.0ml (Amersham-Pharmacia Biotech製)に通塔し、50~300mmol/Lの塩化ナトリウムを含む同緩衝液で溶出した。目的画分を統合し、22.5mlを回収し、そのうち11mlを濃縮し、2.0mg/mlの目的物を含む溶液 860 μ lを得た (収率34.4%)。

<電気泳動>

実施例 1 1と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1~3分子結合体のバンドを確認した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G4000SW_{HL}カラムを用い、実施例 1 1と同様にして分析した。

保持時間: 42.0分 (1分子結合体)

39.5分 (2分子結合体)

参考例 4 10kDa 1本鎖型ポリエチレングリコール修飾ウシCu,Zn型スーパーオキシドディスムターゼの製造

略号: 10SCM-bSOD

ウシCu,Zn型SOD溶液 (2.0mg/ml、50mmol/Lほう酸緩衝液 (pH9.0)、和光純薬製) 1.0mlに参考例 2と同様にして得られた10SCMのNHSエステル 18.8mg (蛋白質1モルあたり15モル) を加え、4°Cで一昼夜反応させた。次に、この反応液を2.0mlのSP-Sepharose F. F.カラム (Amersham-Pharmacia Biotech社) で精製した。0.1~1.0mol/Lの塩化ナトリウムを含む緩衝液で溶出した後、未修飾SODを含まない目的画分を濃縮し、5.9mg/mlの溶液を120 μ l得た (収率35.4%)。さらにCuSO₄、ZnSO₄水溶液を各々、10mmol/Lになるように加えて活性を回復した。

<電気泳動>

実施例 1 1と同様の条件でSDS-PAGEを行い、1~3分子結合体のバンドを確認した。

参考例 5 組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子 (rhG-CSF) 誘導体の調製

配列番号 3 に示したアミノ酸配列を有するhG-CSFの1番目のスレオニンをアラニンに、3番目のロイシンをスレオニンに、4番目のグリシンをチロシンに、5番目のプロリンをアルギニンに、17番目のシステインをセリンにそれぞれ置換したrhG-CSF誘導体を、特公平7-96558に記載の方法により取得した。

上記のrhG-CSF誘導体をコードするDNAを含むプラスミドpCfBD28を保有する大腸菌W3110strA株 (Escherichia coli ECfBD28 FERM BP-1479) をLG培地 [バクトトリプトン10g、酵母エキス5g、塩化ナトリウム5g、グルコース1gを水1Lに溶かし、NaOHでpHを7.0とする] で37°C、18時間培養し、この培養液 5mlを25 μ g/mlのトリプトファンと50 μ g/mlのアンピシリンを含むMCG培地 (Na₂HPO₄ 0.6%、KH₂PO₄ 0.3%、塩化ナトリウム0.5%、カザミノ酸0.5%、MgSO₄ 1mmol/L、ビタミンB 14 μ g/ml、pH7.2) 100mlに摂取し、30°Cで4~8時間培養後、トリプトファンの誘導物質である3 β -インドールアクリル酸 (3 β -indoleacrylic acid、以下IAAと略す) を10 μ g/ml加え、さらに2~12時間培養を続けた。培養液を8,000rpmで、

10分間遠心して集菌し、30mmol/L塩化ナトリウム水溶液、30mmol/Lトリス・塩酸緩衝液 (pH7.5) で洗浄した。洗浄菌体を上記緩衝液 30mlに懸濁し、0°Cで10分間超音波破碎 (BRANSON SONIC POWER COMPANY社、SONIFIER CELL DISRUPTOR 200、OUTPUT CONTROL 2) した。該超音波破碎物を9,000rpmで、30分間遠心分離して菌体残渣を得た。

菌体残渣からマーストンらの方法 [バイオ・テクノロジー (BIO/TECHNOLOGY)、第2巻、800頁 (1984年)] に準じ、rhG-CSF誘導体を抽出・精製・可溶化・再生した。

参考例6 組換え型ヒトインターフェロン- β (未修飾rhIFN- β) の製造

rhIFN- β は、水上ら [Biotechnology Letter、第8巻、605頁 (1986年)] および久我ら [現代化学増刊12: 医学における遺伝子工学、135頁 (1986年)、東京化学同人] の方法に従って製造した。

rhIFN- β をコードするDNAを含むプラスミドpMG-1を保有する大腸菌K-12株をLGTrpAp培地 (バクトトリプトン10g/l、酵母エキス5g/l、塩化ナトリウム5g/l、グルコース1g/l、L-トリプトファン50mg/l、アンピシリン50 μ g/l) でシード培養した。rhIFN- β の生産には2リッタージャー発酵槽でMCGAp培地 (M9培地にカザミノ酸0.5%、アンピシリン50 μ g/mlを添加) を用い、グルコース濃度を1%に、pHを6.5に維持して数日間20°Cで培養した。なお、培養液は750rpmで振とうし、毎分1Lでエアレーションした。培養液から凍結融解法 [DNA、2巻、265頁 (1983年)] で抽出液を調製した。さらに、菌体残渣から特開昭61-69799に開示された方法に従ってrhIFN- β を得た。

参考例7 組換え型ヒトインターフェロン- γ の製造

rhIFN- γ は、前記rhIFN- β の製造法に準じ、伊藤ら [医科分子生物学、355頁 (1987年)、南江堂] および久我ら (現代化学増刊12: 医学における遺伝子工学、135頁 (1986年)、東京化学同人] の方法に従って製造した。

rhIFN- γ をコードするDNAを含むプラスミドpKYP10を保有する大腸菌pGKA2株をLGTrpAp培地 (バクトトリプトン10g/l、酵母エキス5g/l、塩化ナトリウム5g/l、グルコース1g/l、L-トリプトファン50mg/l、アンピシリン50 μ g/l) でシード培

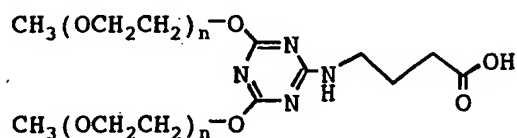
養した。rhIFN- γ の生産には2リッタージャー発酵槽でMCGap培地（M9培地にカザミノ酸0.5%、アンピシリン50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を添加）を用い、グルコース濃度を1%に、pHを6.5に維持して1~2日間、37°Cで培養した。なお、培養液は750rpmで振とうし、毎分1Lでエアレーションした。培養液を8,000rpmで、10分間遠心して集菌し、30mmol/L塩化ナトリウム水溶液、30mmol/Lトリス・塩酸緩衝液（pH7.5）で洗浄した。洗浄菌体を上記緩衝液30mlに懸濁し、0°Cで10分間超音波破碎（BRANSON SONIC POWER COMPANY社、SONIFIER CELL DISRUPTOR 200、OUTPUT CONTROL 2）した。該超音波破碎物を9,000rpmで、30分間遠心分離して菌体残渣を得た。

さらに、菌体残渣に尿素や塩酸グアニジン等の強力な蛋白質変性剤を加えて rhIFN- γ を溶解した後に、マーストンらの方法 [バイオ・テクノロジー (BIO/TECHNOLOGY)、2巻、800頁 (1984年)] に準じ、rhIFN- γ を抽出・精製・可溶化・再生した。

参考例 8 従来型 2 本鎖分岐型 PEG 試薬の調製

略号：5PEG₂GABA

構造：



平均分子量5,000のモノメトキシポリエチレングリコール〔日本油脂（株）社製〕 2.0g、酸化亜鉛 444mg、乾燥ベンゼン 10mlをナスフラスコに入れ、オイルバスで90～95℃に加熱し、初留 4mlを除去した。さらに、5時間還流し、室温まで冷却後、塩化シアヌル 36mg、モレキュラーシーブス4A 1gを加え、3日間脱水還流した。反応液を冷却後、3,000rpmで遠心分離し、上清をジエチルエーテルに滴下し、生成した沈殿を回収し、減圧乾燥した。得られた白色粉末1gをγ-アミノ酪酸 30mgを含む0.1mol/Lほう酸緩衝液（pH10.0） 10mlに溶解し、4℃で3日間反応した。1mol/L塩酸を加えてpHを1～2に調整した後、クロロホルムで抽出した。クロロホルム層を濃縮し、ジエチルエーテルに滴下して生成した沈

殿 930mgを回収した。これを930mlの水に溶解し、80mlのDEAE Sepharose F.F. カラム (Amersham-Pharmacia Biotech社) で精製した。目的画分を回収し、1mol/L 塩酸でpH1~2に調整した後、適当量のクロロホルムで抽出し、減圧濃縮した。濃縮液をジエチルエーテルに滴下し、生成した沈殿を減圧乾燥し、目的物を618mg得た (収率62%)。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G-2000SW_{XL}カラムを用い、実施例1と同様に分析した。

保持時間: 12.4分

<¹H-NMR分析 (300MHz) >

δ (ppm): 2.38(t, 2H, J=6.92), 1.95(m, 2H), 5.66(brt, J=6.33Hz, 1H), 4.43(brm, 2H), 3.38(s, 6H), 3.64(brs, 8nH)

参考例9 組換え型ヒト顆粒球コロニー形成刺激因子の調製

配列番号3に示したアミノ酸配列を有するrhG-CSFを参考例5に記載した方法に準じて調製した。

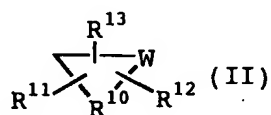
産業上の利用可能性

本発明の新規な分岐型の構造を有するポリアルキレングリコール類は生理活性ポリペプチド類の化学修飾試剤として有用である。さらに、該ポリアルキレングリコール修飾生理活性ペプチドは非修飾ペプチドと同様の生物活性を保持しているだけでなく、体内に投与されたときに長時間有効にその生理活性を示し、該生理活性に関連した症状の改善剤または治療剤として有用である。

請求の範囲

1. 平面構造以外の環状構造を含有する基に2本の1本鎖ポリアルキレングリコール類が結合し、かつポリペプチド中のアミノ酸側鎖、N末端アミノ基またはC末端カルボキシル基と反応性を有する基か、該反応性を有する基に変換可能な基が結合した分岐型ポリアルキレングリコール類。

2. 平面構造以外の環状構造を含有する基が、式 (II)



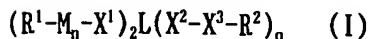
[式中、 R^{10} は $(\text{CH}_2)_u$ (式中、 u は1~10の整数を表す) または $\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_{ua}$ (式中、 ua は0~8の整数を表す) を表し、

R^{11} 、 R^{12} および R^{13} は同一または異なって、水素原子、水酸基、置換もしくは非置換の低級アルキル、低級アルコキシ、アミノ、カルボキシ、シアノまたはホルミルを表し、

W は O 、 S 、 CH_2 または NR^{14} (式中、 R^{14} は水素原子または低級アルキルを表す) を表す] で表される化合物から水素原子を3~5個除いた基である請求の範囲第1項記載の分岐型ポリアルキレングリコール類。

3. W が CH_2 であり、かつ u が4である請求の範囲第2項記載の分岐型ポリアルキレングリコール類。

4. 式 (I)



{式中、 L は平面構造以外の環状構造を含有する3~5分岐が可能な基を表し、 M は OCH_2CH_2 、 $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ 、 $\text{OCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$ 、 $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_r-(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)_s$ (式中、 r および s は同一または異なって、任意の正の整数を表す) または $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{ra}-$

$[\text{OCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2]_{\text{sa}}$ (式中、raおよびsaはそれぞれ前記rおよびsと同義である)を表し、

nは任意の正の整数を表し、

qは1~3の整数を表し、

R¹は水素原子、低級アルキルまたは低級アルカノイルを表し、

R²はポリペプチド中のアミノ酸側鎖、N末端アミノ基またはC末端カルボキシル基と反応性を有する基か、該反応性を有する基に変換可能な基を表し、

X¹は結合、O、S、アルキレン、 $\text{O}(\text{CH}_2)_{\text{ta}}$ (式中、taは1~8の整数を表す)、 $(\text{CH}_2)_{\text{tb}}$ 0

(式中、tbは前記taと同義である)、NR³ (式中、R³は水素原子または低級アルキルを表す)、R⁴-NH-C(=O)-R⁵ [式中、R⁴は結合、アルキレンまたは $\text{O}(\text{CH}_2)_{\text{tc}}$ (式中、tcは前記taと同義である)を表し、R⁵は結合、アルキレンまたはOR^{5a} (式中、R^{5a}は結合またはアルキレンを表す)を表す]、R⁶-C(=O)-NH-R⁷ [式中、R⁶は結合、アルキレンまたはR^{6a}0 (式中、R^{6a}は前記R^{5a}と同義である)を表し、R⁷は結合、アルキレンまたは $(\text{CH}_2)_{\text{td}}$ 0 (式中、tdは前記taと同義である)を表す]、R⁸-C(=O)-O (式中、R⁸は前記R^{5a}と同義である)またはO-C(=O)-R⁹ (式中、R⁹は前記R^{5a}と同義である)を表し、

X²は結合、Oまたは $(\text{CH}_2)_{\text{te}}$ 0 (式中、teは前記taと同義である)を表し、

X³は結合またはアルキレンを表し、2つのR¹-M_n-X¹および1つ~3つのX²-X³-R²はそれぞれ同一でも異なってもよい} で表される分岐型ポリアルキレングリコール類。

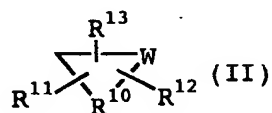
5. qが1である請求の範囲第4項記載の分岐型ポリアルキレングリコール類。

6. nが10~100,000であり、rおよびs並びにraおよびsaが同一または異なって、1~100,000である請求の範囲第4項または5項記載の分岐型ポリアルキレングリコール類。

7. R²が水酸基、カルボキシ、ホルミル、アミノ、ビニルスルホニル、メルカプト、シアノ、カルバモイル、ハロゲン化カルボニル、ハロゲン化低級ア

ルキル、イソシアナート、イソチオシアナート、オキシラニル、低級アルカノイルオキシ、マレイミド、スクシンイミドオキシカルボニル、置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニル、ベンゾトリアゾリルオキシカルボニル、フタルイミドオキシカルボニル、イミダゾリルカルボニル、置換もしくは非置換の低級アルコキシカルボニルオキシ、置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニルオキシ、トレシル、低級アルカノイルオキシカルボニル、置換もしくは非置換のアロイルオキシカルボニル、置換もしくは非置換のアリールジスルフィドまたはアジドである請求の範囲第4項～6項のいずれかに記載の分岐型ポリアルキレングリコール類。

8. Lが式 (II)



(式中、 R^{10} は前記と同義であり、 R^{11} 、 R^{12} および R^{13} はそれぞれ前記と同義であり、 W は前記と同義である)で表される化合物から水素原子を3～5個除いた基である請求の範囲第4項～7項のいずれかに記載の分岐型ポリアルキレングリコール類。

9. W が CH_2 であり、かつ u が4である請求の範囲第8項記載の分岐型ポリアルキレングリコール類。

10. 分子量が500～1,000,000である請求の範囲第1項～9項のいずれかに記載の分岐型ポリアルキレングリコール類。

11. 生理活性ポリペプチドまたはその誘導体が少なくとも1個の請求の範囲第1項～10項のいずれかに記載の分岐型ポリアルキレングリコール類で直接もしくはスペーサーを介して修飾された化学修飾ポリペプチド。

12. 生理活性ポリペプチドが酵素、サイトカインまたはホルモンである請求の範囲第11項記載の化学修飾ポリペプチド。
13. 請求の範囲第11項記載の化学修飾ポリペプチドを含有する医薬。
14. 化学修飾ポリペプチドが、インターフェロン類が化学修飾された化学修飾ポリペプチドである請求の範囲第13項記載の医薬。
15. インターフェロン類が少なくとも1個の請求の範囲第1項～10項のいずれかに記載の分岐型ポリアルキレングリコール類で直接もしくはスパーサーを介して修飾された化学修飾ポリペプチドを含有する多発性硬化症治療薬。
16. インターフェロン類がインターフェロン- β である請求の範囲第15項記載の多発性硬化症治療薬。

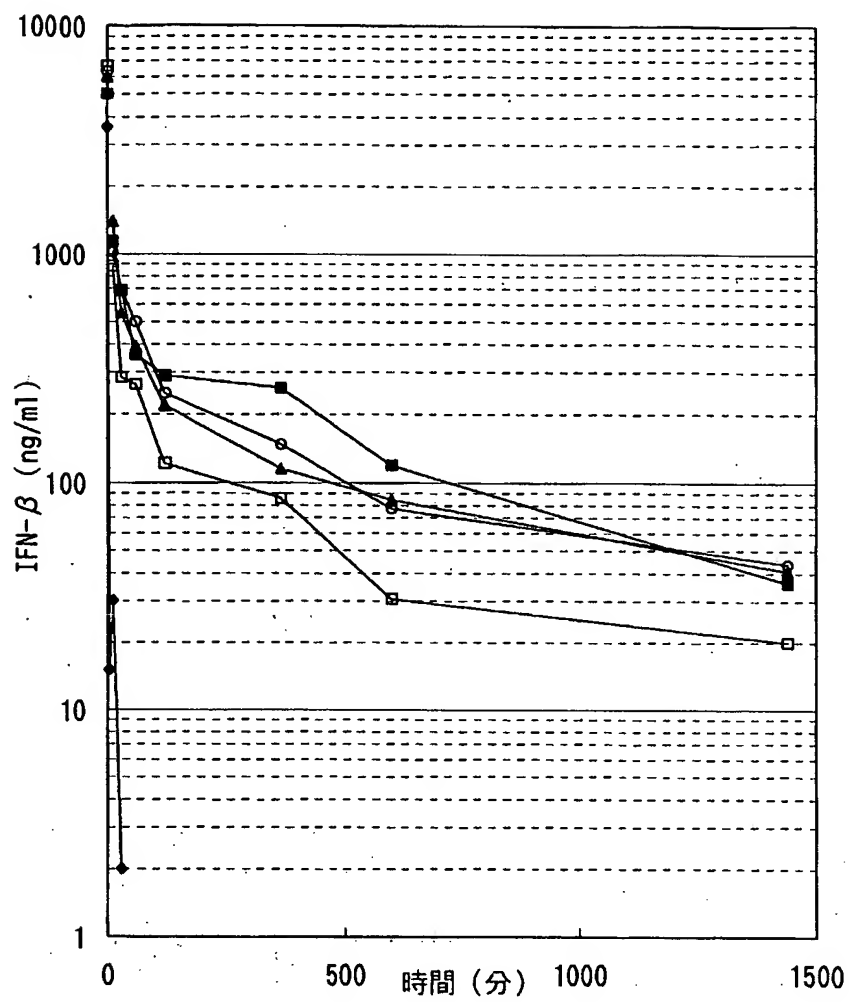


図 1

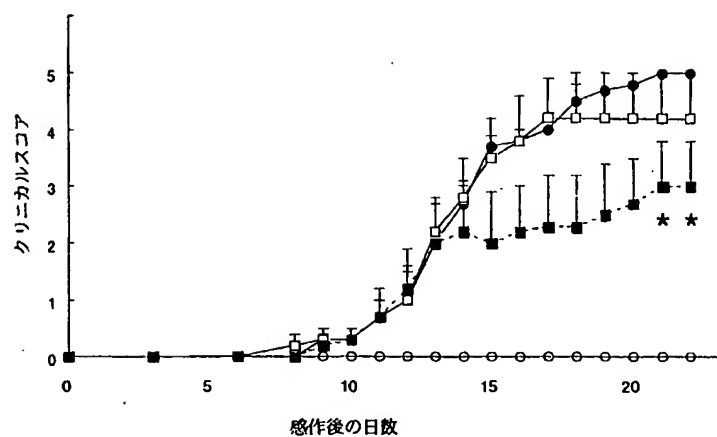


図 2

配 列 表

SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD

<120> Novel branched polyalkylene glycol derivatives

<130> 11265W01

<140>

<141>

<150> JP 99/366312

<151> 1999-12-24

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 166

<212> PRT

<213> Hominidae

<400> 1

Met	Ser	Tyr	Asn	Leu	Leu	Gly	Phe	Leu	Gln	Arg	Ser	Ser	Asn	Phe
1				5					10				15	
Gln	Cys	Gln	Lys	Leu	Leu	Trp	Gln	Leu	Asn	Gly	Arg	Leu	Glu	Tyr
				20					25				30	

Cys	Leu	Lys	Asp	Arg	Met	Asn	Phe	Asp	Ile	Pro	Glu	Glu	Ile	Lys		
				35					40				45			
Gln	Leu	Gln	Gln	Phe	Gln	Lys	Glu	Asp	Ala	Ala	Leu	Thr	Ile	Tyr		
				50					55				60			
Glu	Met	Leu	Gln	Asn	Ile	Phe	Ala	Leu	Phe	Arg	Gln	Asp	Ser	Ser		
				65					70				75			
Ser	Thr	Gly	Trp	Asn	Glu	Thr	Ile	Val	Glu	Asn	Leu	Leu	Ala	Asn		
				80					85				90			
Val	Tyr	His	Gln	Ile	Asn	His	Leu	Lys	Thr	Val	Leu	Glu	Glu	Lys		
				95					100				105			
Leu	Glu	Lys	Glu	Asp	Phe	Thr	Arg	Gly	Lys	Leu	Met	Ser	Ser	Leu		
				110					115				120			
His	Leu	Lys	Arg	Tyr	Thr	Gly	Arg	Ile	Leu	His	Tyr	Leu	Lys	Ala		
				125					130				135			
Lys	Glu	Tyr	Ser	His	Cys	Ala	Trp	Thr	Ile	Val	Arg	Val	Glu	Ile		
				140					145				150			
Leu	Arg	Asn	Phe	Tyr	Phe	Ile	Asn	Arg	Leu	Thr	Gly	Tyr	Leu	Arg	Asn	
				155					160				165	166		

<210> 2

<211> 146

<212> PRT

<213> Hominidae

<400> 2

Cys Tyr Cys Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu Asn Leu Lys
1 5 10 15
Lys Tyr Phe Asn Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr
20 25 30

Leu Phe Leu Gly Ile Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg

35 40 45

Lys Ile Met Gln Ser Gln Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe

50 55 60

Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr

65 70 75

Ile Lys Glu Asp Met Asn Val Lys Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys

80 85 90

Lys Arg Arg Asp Phe Glu Lys Leu Thy Asn Tyr Ser Val Thr Asp

95 100 105

Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala Ile His Glu Leu Ile Gln Val Met

110 115 120

Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys Arg Lys Arg Ser

125 130 135

Gln Met Leu Phe Arg Gly Arg Arg Ala Ser Gln

140 145 146

<210> 3

<211> 174

<212> PRT

<213> Hominidae

<400> 3

Met Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu

-1 1 5 10 15

Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu

20 25 30

Gln Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu

35 40 45

Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser
50 55 60
Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His
65 70 75
Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile
80 85 90 95
Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala
100 105 110
Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala
115 120 125
Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala
130 135 140
Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser
145 150 155
Phe Leu Glu Val Ser TyrArg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro
160 165 170 174

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/09159

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C08G65/337, A61K38/21, 47/48, A61P21/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C08G65/00-65/48, A61K38/21, 47/48, A61P21/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1926-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2001
 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2001 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2001

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI/L

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, 97/10281, A (BRACCO SPA), 20 March, 1997 (20.03.97), Claims	1-13
Y	& AU, 717922, B & NO, 9801092, A & ZA, 9607759, A & EP, 850262, A & US, 5807971, A & IT, 1277596, B & JP, 11-514396, A & KR, 99044595, A	14-16
X	JP, 8-510255, A (Protein Delivery, Inc.), 29 October, 1996 (29.10.96), Claims	1,2,10-15
Y	& US, 5359030, A & WO, 94/26778, A & AU, 694919, B & EP, 707596, A & CN, 1120457, A & IL, 109619, A	16
Y	JP, 9-504299, A (Enzon Inc.), 28 April, 1997 (28.04.97), Claims; page 17, lines 19-24 & WO, 97/01563, A	14-16

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search.
22 March, 2001 (22.03.01)Date of mailing of the international search report
03 April, 2001 (03.04.01)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP00/09159

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ C08G65/337, A61K38/21, 47/48, A61P21/00		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ C08G65/00-65/48, A61K38/21, 47/48, A61P21/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1926-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2001年 日本国実用新案登録公報 1996-2001年 日本国登録実用新案公報 1994-2001年		
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
WPI/L		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	WO, 97/10281, A (BRACCO SPA) 20. 3月. 1997 (20. 03. 97) 特許請求の範囲&AU, 717922, B&NO, 980109 2, A&ZA, 9607759, A&EP, 850262, A&U S, 5807971, A&IT, 1277596, B&JP, 11 -514396, A&KR, 99044595, A	1-13 14-16
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列举されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリ 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	22. 03. 01	国際調査報告の発送日
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 吉澤 英一 電話番号 03-3581-1101 内線 3493

C (続き) ... 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	JP, 8-510255, A (プロテイン, デリバリー, インコーポレイテッド) 29. 10月. 1996 (29. 10. 96) 特許請求の範囲&US, 5359030, A&WO, 94/26778, A&AU, 694919, B&EP, 707596, A&CN, 1120457, A&IL, 109619, A	1, 2, 10-15 16
Y	JP, 9-504299, A (エンゾン, インコーポレーテッド) 28. 4月. 1997 (28. 04. 97) 特許請求の範囲及び第17頁第19-24行&WO, 97/01563, A	14-16